



PC I

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類7 A61K 31/704, 45/00, A61P 25/00, 43/00, G01N 33/15, 33/50 // C07J 17/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/48608</p> <p>(43) 国際公開日 2000年8月24日(24.08.00)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP99/06804</p> <p>(22) 国際出願日 1999年12月3日(03.12.99)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平11/41517 1999年2月19日(19.02.99) JP 特願平11/340850 1999年11月30日(30.11.99) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 科学技術振興事業団 (JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY CORPORATION) [JP/JP] 〒332-0012 埼玉県川口市本町4丁目1番8号 Saitama, (JP)</p> <p>(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 阪中雅広(SAKANAKA, Masahiro)[JP/JP] 〒791-0204 愛媛県温泉郡重信町大字志津川1191番地13 Ehime, (JP) 田中潤也(TANAKA, Junya)[JP/JP] 〒791-0203 愛媛県温泉郡重信町大字横河原1375 愛大横河原宿舎115号 Ehime, (JP) 佐藤康二(SATO, Kohji)[JP/JP] 〒433-8118 静岡県浜松市相生町4番13-505号 Shizuoka, (JP)</p>		<p>(74) 代理人 弁理士 佐伯憲生(SAEKI, Norio) 〒103-0027 東京都中央区日本橋三丁目15番2号 高愛ビル9階 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 CN, KR, US, 欧州特許 (CH, DE, FR, GB, IT)</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54)Title: Cerebrovascular regeneration/reconstruction promoters and nerve tissue secondary degeneration inhibitors comprising ginsenoside Rb₁</p> <p>(54)発明の名称 ジンセノサイドRb₁からなる脳血管再生・再構築促進剤ならびに神経組織二次変性抑止剤</p> <p>(57) Abstract Efficacious preparations for intravenous administration containing ginsenoside Rb₁ or its salt which are useful as vascular regeneration/reconstruction promoters and nerve tissue secondary degeneration inhibitors. These preparations are useful particularly in regenerating and reconstructing the cerebrovascular network after cerebral stroke and inhibiting nerve tissue secondary degeneration.</p>		

(57)要約

本発明は血管再生・再構築促進剤ならびに神経組織二次変性抑止剤として有用なジンセノサイドRb₁又はその塩の有効な静脈内投与用製剤を提供する。

本発明は、ジンセノサイドRb₁又はその塩を含有してなる静脈内投与用製剤に関し、特に脳卒中後の脳血管網の再生・再構築および神経組織二次変性の抑止のために有用である。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサオ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明 細 書

ジンセノサイド Rb₁ からなる脳血管再生・再構築促進剤ならびに神経組織二次変性抑止剤

技術分野

本発明は、ジンセノサイド Rb₁ もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患の予防、処置又は治療用の医薬組成物に関する。より詳細には、本発明は、神経組織の損傷による神経組織の二次変性、脊髄損傷、頭部外傷、神経組織又は脊髄組織の外傷による疾患、脱髄を伴う神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患の予防、処置又は治療用の医薬組成物に関する。また、本発明は、ジンセノサイド Rb₁ もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる血管の再生又は再構築の促進、又はオリゴデンドロサイトのアポトーシス又はアポトーシス様細胞死を抑止させるための医薬組成物に関する。本発明は、血管再生・再構築促進剤あるいは神経組織二次変性抑止剤として有用なジンセノサイド Rb₁ 又はその塩にも関する。

また、本発明は、前記疾患の予防、処置又は治療用の静脈内投与用製剤に関する。さらに、本発明は、神経組織又は脊髄組織の疾患に対する予防、処置若しくは治療のための有効成分、又は脳細胞保護剤若しくは神経細胞保護剤を探索するためのリード化合物としてのジンセノサイド Rb₁ 又はその代謝産物の使用に関する。

背景技術

元来脳卒中（脳血管障害）の治療法は、脳梗塞（脳血栓・脳塞栓）・脳出血・一過性脳虚血発作・クモ膜下出血で異なっており、厳密には脳のCT検査を実施しなければ有効な対策が立てられないのが現状である。たとえば血栓溶解剤などは一過性脳虚血発作や脳梗塞（脳血栓・脳塞栓）に使用され、脳出血には禁忌とされている。しかし、脳卒中は可及的すみやかに病巣部位の神経細胞を保護する処置がとられなければ、以後永久に高次機能障害をもたらすかあるいは生命予後

に影響を与える重篤な疾患であるので、一刻も早く治療を開始すべき疾患である。極論を言えば、脳のCT検査を実施している時間すら、脳卒中患者にとって回復する可能性を少なくする要因になるのである。まさに急性期脳卒中の治療は脳卒中病変のみならず発症後の時間との戦いと言っても過言ではない。ただ、残念ながら、目下の所、脳卒中の病型（脳梗塞・脳血栓・脳塞栓・脳出血・クモ膜下出血・一過性脳虚血発作）の如何を問わず、脳卒中を発症したと思われる患者に速やかに投与し、著効を示す薬物がほとんど存在しないのが実情である。

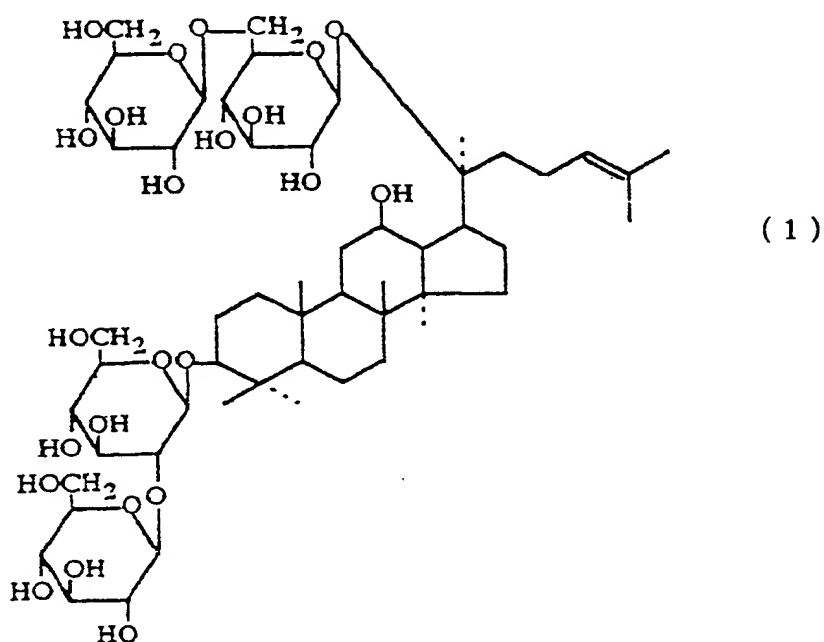
脳卒中の治療で問題になるのは上記のごとく急性期ばかりではない。たとえ、ある強力な神経保護薬の投与により、一時的に脳細胞（グリア細胞を含む）あるいは神経細胞の壊死あるいはアポトーシス様細胞死を防ぐことができて、その後障害部位における脳血管の再生や再構築が生じなければ、長い時間を経てやがては同部位の脳細胞や神経細胞が変性脱落する可能性がある。しかし、現状では脳血管の再生や再構築を促進する薬物もほとんどない。中大脳動脈皮質枝（MCA）が永久閉塞した脳梗塞病変を例にとって、もう少しこのことについて以下に具体的に説明する。MCAが永久閉塞するとMCAだけで栄養されている部位すなわち虚血中心部（ischemic core）の神経細胞はMCAが再開通しない限り、すみやかに壊死に陥り脳梗塞病変が形成されるので、いかなる薬物といえども虚血中心部の脳組織を救うことはまず出来ないと考えられる。なお、特願平10-365560号及びPCT/JP99/02550（「ジンセノサイドRb1からなる脳細胞又は神経細胞保護剤」）で既述したごとく、本明細書では、ネクローシス（壊死）とは異なり緩徐に進行する神経細胞の死を「神経細胞のアポトーシス」あるいは「アポトーシス様神経細胞死」と定義することにする。

一方、虚血巣周辺部（ischemic penumbra）ではMCAからの血液供給がまったくなくなり同部における血管網は著しく少なくなるが、わずかながらも前大脳動脈や後大脳動脈の皮質枝からの血液供給があるので、同部の神経細胞はMCA永久閉塞後しばらくは瀕死の状態で生きていると考えられている。もちろん何の手だても施さなければ、虚血巣周辺部でやがてアポトーシス様神経細胞死が起こり、同部がすべて脳梗塞病変に様変わりすることは周知の事実である。臨床的にはこの虚血巣周辺部（ischemic penumbra）の神経細胞を救うことが最も大切であるが、

上述のごとく強力な神経保護薬で一時的に同部の神経細胞を生かすことができても、その後MCA永久閉塞により破綻あるいは減少した同部の血管網が再生・再構築されない限り、同部の神経細胞は時間をおいて死に至る可能性が高い。従って、神経保護薬に求められる条件として、神経細胞への直接の保護作用に加えて、破綻した虚血巣周辺部血管網の再生・再構築を促すことがあげられる。

今ひとつ脳卒中の治療で問題になるのは、脳の組織学的特徴である。脳内各領域はシナプスを介して互いに複雑な情報ネットワークを形成しているので、ある領域が障害を受けるとその領域とシナプス連絡（あるいは線維連絡ともいう）を有する他の領域でも時間をずらして障害が進行することがよくある。たとえば、一側大脳皮質に脳梗塞病巣（一次病変）が生じると、その後脳梗塞病巣と密なシナプス連絡を有している同側視床で神経細胞死（二次変性）が起こり、同側視床の萎縮が進行するにつれて脳血管性痴呆も悪化することが報告されている。しかも、同側視床が萎縮してその機能が損なわれると、視床とシナプス連絡を有する他の領域でも三次変性が起こり始め、脳卒中患者の脳機能は月日を経るごとに低下し続ける可能性が高い。このような、脳の組織学的特徴に基づく悪循環を断つためには、上記のような二次変性を抑止する薬物が必要である。

ところで、ジンセノサイドRb₁は下記構造式（1）



で示される化合物であり、ジンセノサイド R b₁ は柴田ら (Shibata S., et al., Economic and medicinal plant research, World Scientific, Philadelphia, pp 217-284, 1985) などにより公知の物質である。

ジンセノサイド R b₁ は向神経作用としてその腹腔内投与によりこれまで静穏作用のみが報告されてきたが (Yoshimura H. et al., Eur. J. Pharmacol., 146, 291-287, 1988)、その作用機序についてはまったく解明されていない。また、中枢神経系においては、ジンセノサイド R b₁ とジンセノサイド R g₁ の混合物あるいは 10^{-6} M から 10^{-7} M という高濃度のジンセノサイド R g₁ またはジンセノサイド R b₁ がアセチルコリン含有神経細胞を活性化し、アルツハイマー病に効能を示す可能性があることが報告されているが (米国特許: U S A, 5, 137, 878 号: Composition and method for treatment of senile dementia)、アセチルコリン細胞の機能障害がアルツハイマー病の主要所見であるとは言い難いので、この仮説には解決すべき問題が山積みしている。しかも前記の米国特許文献は、ジンセノサイド R b₁ がアセチルコリン含有神経細胞の生存を延長するか否か、すなわちアセチルコリン細胞を保護するか否かという課題には言及していない。

ジンセノサイド R b₁ の神経細胞保護作用については、本発明者ら (阪中、田中) がジンセノサイド R b₁ の研究を手掛けるまではほとんど解明されていなかった。本発明者ら (阪中、田中) はこれまでジンセノサイド R b₁ が神経細胞保護効果を発揮するかどうかを、スナネズミの一過性前脳虚血モデルを用いて調べてきた。この脳虚血モデル動物では、脳温を 37℃ に維持した状態で 3 分間から 5 分間、総頸動脈血流を遮断すると、血流遮断時間に応じて虚血後 1 週間以内に海馬 C A 1 錐体神経細胞 (アセチルコリン非含有) が変性脱落し (これを遅発性神経細胞死という)、同動物の学習行動機能も低下することが証明されている (Wen T.-C. et al., Acta Neuropathol., 91, 15-22, 1996)。すなわち、スナネズミの一過性前脳虚血モデルはヒトの一過性脳虚血発作の病態を反映すると言える。

本発明者の 1 人 (阪中) は、スナネズミの腹腔内にあらかじめジンセノサイド R b₁ (10 mg/kg/日 または 20 mg/kg/日 、スナネズミの体重を約 70 g としておよそ 0.7 mg/日 または 1.4 mg/日) を 1 日単回 1 週間注入しておく、5 分間の総頸動脈血流遮断による遅発性神経細胞死と学習行動障害

が有意に軽減されることを証明した (Wen T.-C. et al., *Acta Neuropathol.*, 91, 15-22, 1996)。しかしながら、5 分間あるいは 3 分間の総頸動脈血流遮断直後に、ジンセノサイド R b₁ を腹腔内に注入しても効果はみられなかった (Wen T.-C. et al., *Acta Neuropathol.*, 91, 15-22, 1996; Lim J.-H. et al., *Neurosci. Res.*, 28, 191-200, 1997)。従って、この時点で末梢 (腹腔内) 投与されたジンセノサイド R b₁ の脳内移行率および移行速度は非常に低いことが予想されたため、ジンセノサイド R b₁ は海馬 C A 1 錐体神経細胞の保護という観点からは、臨床応用の可能性は皆無と考えられた。

前記のような末梢 (腹腔内) 投与に代えて、ジンセノサイド R b₁ を 3 分間あるいは 3.5 分間の総頸動脈血流遮断の直後に、直接脳室内に持続注入すると遅発性神経細胞死と学習行動障害が抑止されることが、発明者ら (阪中、田中) により報告されている (Lim J.-H. et al., *Neurosci. Res.*, 28, 191-200, 1997)。さらに、脳卒中易発症高血圧自然発症 (S H - S P) ラットの中大脳動脈皮質枝 (M C A) 永久閉塞モデル (脳梗塞ラットもしくは脳塞栓ラット) においても、ジンセノサイド R b₁ を M C A 永久閉塞直後より脳室内へ持続注入すると、大脳皮質梗塞巣が有意に縮小し、同動物の場所学習障害も軽減されることを、発明者ら (阪中、田中) は証明した (Zhang B. et al., *J. Stroke Cerebrovasc. Dis.*, 7, 1-9, 1998)。

しかしながら、ペプチド性因子の脳室内注入を用いた発明者らの研究成果が臨床応用されないことと同様に (Sakanaka M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 95, 4635-4640, 1998; Wen T.-C. et al., *J. Exp. Med.*, 188, 635-649, 1998)、たとえジンセノサイド R b₁ が脳室内への直接投与で効果を示しても投与経路の問題からやはりヒトの一過性脳虚血発作や脳梗塞症例にジンセノサイド R b₁ を応用することはこれまで不可能と考えられてきた。

また、ジンセノサイド R b₁ の末梢 (腹腔内) 投与による神経細胞保護作用のメカニズムについて、本発明者ら (阪中、田中) は、これまでに低濃度 (1 ~ 100 f g / m l) の同薬物をあらかじめ培養液に混入しておく、ヒドロキシルラジカル誘発剤 (硫酸第一鉄) による神経細胞の壊死 (ネクローシス) が軽減されることを報告している (Lim J.-H. et al., *Neurosci. Res.*, 28, 191-200, 199

7; Zhang B. et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998)。本発明者らは、ジンセノサイドRb₁がヒドロキシラジカルを消去することにより、細胞膜の過酸化脂質を減少せしめ、培養神経細胞を保護するものと当初より推測してきたが、この仮説が必ずしも正しくないことが、発明者らの最近の研究（特願平10-365560号、PCT/JP99/02550、いずれも「ジンセノサイドRb₁からなる脳細胞又は神経細胞保護剤」）で判明した。この詳細については後述する。

また、高濃度（0.11～11 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）のジンセノサイドRb₁がグルタミン酸の神経毒性を軽減して神経細胞死を予防すること（Kim Y.-C., et al., J. Neurosci. Res., 53, 426-432, 1998）、あるいは500 μM （550 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ）という高濃度のジンセノサイドRb₁がアポトーシス様神経細胞死を予防する可能性があること（田中知明ら、The Ginseng Review, 24, 61-65, 1998; 瀧野一郎ら、The Ginseng Review, 25, 44-50, 1998）が培養実験で報告されているが、高濃度のジンセノサイドRb₁は本発明者ら（阪中、田中）の培養実験によれば必ずしも神経栄養作用を示さないことが判明している（Lim J.-H. et al., Neurosci. Res., 28, 191-200, 1997; Zhang B. et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998）。

しかも、このように高濃度のジンセノサイドRb₁を生体組織内の細胞外液で再現することは極めて困難であるのみならず、コスト面や副作用出現の可能性を考えると大量のジンセノサイドRb₁を生体に投与することは不可能である。実際、これまでの本発明者ら（阪中、田中）の実験結果からも、高用量のジンセノサイドRb₁は生体にとって必ずしも好ましい効果・効能をもたらさないことが判明している（Zhang B. et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998）。

発明者らは、ジンセノサイドRb₁による神経細胞保護作用のメカニズム解明、同化合物の新たな効能・利用可能性の発明を目指して、低濃度ジンセノサイドRb₁の神経細胞死抑止効果をこれまで明らかにしてきた（特願平10-365560号、PCT/JP99/02550、いずれも「ジンセノサイドRb₁からなる脳細胞又は神経細胞保護剤」）。その結果、ジンセノサイドRb₁が1 fg/ml から100 fg/ml という世界に類をみない低濃度域で、細胞死抑制遺伝子

産物 Bcl-x_L の発現増加を促すことによりアポトーシス様神経細胞死を抑止することを見出した。

すなわち、ジンセノサイド Rb₁ は世界で唯一の非ペプチド性の Bcl-x_L 発現増強剤であることが見出された。また、100 fg/ml の濃度ではわずかにジンセノサイド Rb₁ の過酸化脂質生成抑制効果はみられたが、それよりも低い濃度域ではそのような効果はみられなかった。従って、ジンセノサイド Rb₁ の作用機構に関する従来の仮説、すなわちジンセノサイド Rb₁ は細胞膜の過酸化脂質を減少せしめることにより神経細胞を保護するという仮説、は妥当ではないことが判明した。

本発明者らはさらにジンセノサイド Rb₁ が静脈内投与により、これまでまったく予想すらされなかった優れた脳梗塞抑止作用ならびに場所学習障害改善作用を示すこともすでに見出している（特願平10-365560号、PCT/JP99/02550、いずれも「ジンセノサイド Rb₁ からなる脳細胞又は神経細胞保護剤」）。

しかしながら、ジンセノサイド Rb₁ の静脈内投与が終了した後でも、もし同化合物投与により脳梗塞に陥ることを免れていた脳組織中、すなわち虚血巣周辺部、で血管の再生や再構築が起きていなければ、ジンセノサイド Rb₁ 投与終了後に時間をおいて同部で新たな脳障害が出現する可能性が高い。また、ジンセノサイド Rb₁ の静脈内投与により大脳皮質の一次梗塞病変が縮小しても、大脳皮質と密なシナプス連絡を有する視床の二次変性が抑止されていなければやはりジンセノサイド Rb₁ 静脈内投与の効果・効能も充分に発揮されないこともあり得る。

本発明者らは、ジンセノサイド Rb₁ が静脈内投与により、虚血巣周辺部 (ischemic penumbra) における血管網の再生および再構築を促進することを見出し本発明を完成した。また、本発明者らは、ジンセノサイド Rb₁ が静脈内投与により、大脳皮質梗塞後に生じる視床の二次変性ならびに脊髄損傷後に生じる神経組織の二次変性を抑止することを見出し本発明を完成した。

発明の開示

本発明の目的は脳卒中後の静脈内投与により優れた脳血管再生および再構築促

進作用を示し、かつ神経組織の二次変性を抑止することにより障害を受けた脳を長期的に保護する薬物を提供することである。

また、本発明は脳卒中後の脳血管再生・再構築促進剤あるいは神経組織二次変性抑止剤として有用なジンセノサイドRb₁又はその塩の有効な投与用製剤を提供する。より詳細には、ジンセノサイドRb₁若しくはその塩を含有してなる脳血管再生・再構築促進用医薬組成物、又はジンセノサイドRb₁若しくはその塩を含有してなる神経組織二次変性抑止作用を示す医薬組成物を提供するものである。また、本発明は、ジンセノサイドRb₁若しくはその塩を含有してなる脳・神経疾患の長期にわたる治療、予防又は処置などのために有用な静脈内投与用製剤を提供するものである。

図面の簡単な説明

第1図は、ジンセノサイドRb₁を静脈内に注入したラットを用いた水迷路テストの結果を示す図である。第1図の左側は中大脳動脈永久閉塞後2週目の結果であり、同右側は中大脳動脈永久閉塞後4週目の結果である。また、第1図中の黒丸印(●)は偽手術をしたラットのものであり、白丸印(○)は手術後、生理食塩水のみを投与したものであり、黒四角印(■)はジンセノサイドRb₁を6 μ g/日投与したものであり、白四角印(□)はジンセノサイドRb₁を60 μ g/日投与したものである。なお、データはmeans \pm SEで表示されており、統計解析法はANOVA+FisherのPLSDによる。

第2図は、ジンセノサイドRb₁を静脈内に注入したラットにおける大脳皮質梗塞比率を示す図である。なお、データはmeans \pm SEで表示されており、統計解析法はMann-Whitney Uテストによる。

第3図は、大脳皮質梗塞巣を示す図面に代わる写真である。Aが生理食塩水投与例、BがジンセノサイドRb₁投与例である。

第4図は、実施例1、2、3の結果をまとめた模式図である。

第5図は、5 μ m厚脳切片に占める頭頂葉梗塞巣周辺部の血管面積測定域を示す図である。

第6図は、健常側(対照側)ならびに虚血側の梗塞巣周辺(すなわち虚血巣周

辺部)を示す図面に代わる微分干渉顕微鏡写真である。

第7図は、視床VP核を示す図面に代わる光学顕微鏡写真を示す。Aが偽手術動物のもの、Bが生理食塩水投与虚血動物のもの、CがジンセノサイドRb₁(60 μ g/日)投与虚血動物のものである。バーは100 μ mを示す。

第8図は、脊髄(下位胸髄)損傷後2日目のラットを示す図面に代わる写真である。Aが生理食塩水投与例であり、BがジンセノサイドRb₁(60 μ g/日)静脈内投与例である。

(以下余白)

第9図は、脊髄損傷後7日目における、生理食塩水投与ラット、及びジンセノサイドRb₁ (12 μ g/日、60 μ g/日) 投与ラットのBBBスコア (score) を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明は、ジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患の予防、処置又は治療用の医薬組成物に関する。より詳細には、本発明は、神経組織の損傷による神経組織の二次変性、脊髄損傷、神経組織又は脊髄組織の外傷による疾患、脱髄などの神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患の予防、処置又は治療用の医薬組成物に関する。

本発明のジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩は、血管の再生又は再構築の促進作用、又はオリゴデンドロサイトのアポトーシス又はアポトーシス様細胞死を抑制する作用を有し、したがって、本発明は、血管再生・再構築促進剤、好ましくは脳卒中後の脳血管再生・再構築の促進剤、神経組織の二次変性の抑止剤、又は、オリゴデンドロサイトのアポトーシス又はアポトーシス様細胞死の抑制剤にも関する。

また、本発明は、ジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる、神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患を血管の再生又は再構築の促進作用、好ましくは脳卒中後の脳血管再生・再構築を促進する作用、又はオリゴデンドロサイトのアポトーシス又はアポトーシス様細胞死を抑制する作用により予防、処置又は治療するための医薬組成物に関する。

さらに、本発明は、ジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる血管の再生又は再構築を促進させるための医薬組成物、神経組織の二次変性の予防、処置又は治療用医薬組成物、神経組織又は脊髄組織の外傷の予防、処置又は治療用医薬組成物、オリゴデンドロサイトのアポトーシス又はアポトーシス様細胞死を抑止させるための医薬組成物、脊髄損傷の予防、処置又は治療用医薬組成物、及び、脱髄の予防、処置又は治療用医薬組成物に関する。

また、本発明は、ジンセノサイドRb₁又はその代謝産物が神経組織又は脊髄組

織の疾患に対する予防、処置又は治療に極めて有効であることを見出したものであり、したがって本発明はジンセノサイドRb₁又はその代謝産物をリード化合物として、神経組織又は脊髄組織の疾患に対する予防、処置又は治療のための有効成分を探索する方法に関する。

さらに、本発明は、神経組織又は脊髄組織の疾患に対する予防、処置又は治療のための有効成分を探索するためのリード化合物としてのジンセノサイドRb₁又はその代謝産物の使用、及び、脳細胞保護剤または神経細胞保護剤を探索するためのリード化合物としてのジンセノサイドRb₁又はその代謝産物の使用に関する。本発明は、前記した方法または使用により得られた神経組織又は脊髄組織の疾患に対する予防、処置又は治療剤にも関する。

さらに、本発明は、神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患の予防、処置又は治療用医薬組成物を製造するためのジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩の使用、並びに、血管の再生又は再構築を促進させるための医薬組成物、神経組織の二次変性の予防、処置又は治療用医薬組成物、神経組織又は脊髄組織の外傷の悪化予防、処置又は治療用医薬組成物、オリゴデンドロサイトのアポトーシス又はアポトーシス様細胞死を抑止させるための医薬組成物、脊髄損傷の悪化予防、処置又は治療用医薬組成物、及び、脱髄の予防、処置又は治療用医薬組成物を製造するためのジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩の使用に関する。

本発明の医薬組成物は、ジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩を低濃度で含有してなるものが好ましい。また、本発明の医薬組成物は、静脈内投与や粘膜投与などの非経口投与形態のものが好ましい。より詳細には、本発明の医薬組成物は、ジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩を低濃度で含有してなる非経口投与製剤が好ましい。

また、本発明は、ジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩を好ましくは低濃度で含有してなる前記疾患の予防、処置又は治療用の非経口投与製剤、好ましくは静脈内投与用製剤に関する。

これらの本発明の医薬組成物は、静脈内投与用製剤が好ましいが病変部局所外

用剤、病変部局所注射剤、経口投与製剤、点鼻薬、点眼薬、坐薬、皮下注射薬、皮内注射薬、筋肉注射薬、吸入薬、舌下薬、経皮吸収薬等、任意の投与経路が選択できる。

また、本発明は前記の静脈内投与用製剤又は病変部局所外用剤などからなる脳・神経疾患の長期にわたる治療、予防、若しくは処置剤、又は脳血管再生・再構築促進剤もしくは神経組織の二次変性抑止剤に関する。

また、本発明者らは、ジンセノサイド Rb₁ 又はその代謝産物が、血管の再生又は再構築の促進作用、特に脳卒中後の脳血管再生・再構築の促進作用、又はオリゴデンドロサイトのアポトーシス又はアポトーシス様細胞死を抑制する作用を有することを初めて見出したものであり、したがって、本発明は、ジンセノサイド Rb₁ 又はその代謝産物を神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患の予防、処置又は治療用の他の有効成分を探索するためのリード化合物として使用することができることを提供するものである。また、ジンセノサイド Rb₁ の化学構造の一部を修飾してプロドラッグを作成したのちに、任意の投与経路を選択することも可能である。さらに、ジンセノサイド Rb₁ もしくはその代謝産物の標的分子を同定することにより、標的分子の機能を修飾する新規化合物をも合成して脊髄損傷・神経外傷・外傷治療薬の開発を目指すこともできる。

したがって、本発明は、これらの疾患の新しい予防、処置又は治療用の有効成分を探索するためのリード化合物としてのジンセノサイド Rb₁ 又はその代謝産物を提供するものでもある。

本発明のジンセノサイド Rb₁ は前記した構造式で示されるものであり、ジンセノサイド Rb₁ は、例えば、柴田ら (Shibata S. et al., Economic and medicinal Plant research, World Scientific, Philadelphia, pp 217-284, 1985) の方法に準じて分離・精製することができる。このような方法により精製されたものはその純度が 98% 以上であることが、薄層クロマトグラフィーならびに核磁気共鳴スペクトルにより確認されている (Kawashima Y. and Samukawa K., J. Med. Pharmacol. Soc. Wakan-Yaku, 3, 235-236, 1986)。

本発明のジンセノサイド Rb₁ は遊離のものを使用することもできるが、それを

適当な塩と使用することもできる。また、それらの水和物のような溶媒和物として使用することもできる。

本発明のジンセノサイドRb₁の濃度は、特願平10—365560号及びPCT/J P 99 / 0 2 5 5 0 (「ジンセノサイドRb₁からなる脳細胞又は神経細胞保護剤」)で記述されたごとく低濃度が好ましく、より具体的には、細胞外液濃度が1 ng / ml 以下、好ましくは1 pg / ml 以下、より好ましくは100 fg / ml 以下となる濃度である。本発明のジンセノサイドRb₁を、静脈内投与用製剤として使用する場合にも、患者の患部における細胞外液濃度が前記の濃度になるように製剤を調整することが好ましい。本発明の医薬組成物や製剤は、患部組織の細胞外液濃度が1 ~ 100 fg / ml 程度でも十分な効果が得られる。

静脈内投与されたジンセノサイドRb₁は、従来の末梢(腹腔内)投与によるものとは異なり、脳・神経系に速やかに伝達されることがすでに見出されている(特願平10—365560号、PCT/J P 99 / 0 2 5 5 0、いずれも「ジンセノサイドRb₁からなる脳細胞又は神経細胞保護剤」)。本発明の静脈内投与用製剤は、血管内、好ましくは静脈に直接投与できるものであればよく、生理食塩水、蒸留水、リン酸緩衝液、ブドウ糖液、リボソーム、脂肪乳剤等に溶解したのちに、単回静脈内注入用製剤もしくは静脈内持続投与用製剤として使用できる。また、点滴用組成物などの静脈投与製剤に添加して使用できる剤形であってもよい。また、ジンセノサイドRb₁の化学構造の一部を修飾してプロドラッグを作成し、任意の投与経路、投与方法を選択することができる。たとえば、ジンセノサイドRb₁の水酸基をエステル化してプロドラッグを作成し、脳血液関門を通過せしめたのち、内因性エステラーゼで加水分解して脳内へのジンセノサイドRb₁移行量を増やすことも可能となる。

特願平10—365560号及びPCT/J P 99 / 0 2 5 5 0 (「ジンセノサイドRb₁からなる脳細胞又は神経細胞保護剤」)に記述されたごとく、ジンセノサイドRb₁は静脈内投与で脳梗塞巣を非投与群の1 / 4程度にまで縮小させ、しかも細胞死抑制遺伝子産物Bcl-x_L発現増強というユニークな作用機序を有し、脳の神経細胞を保護するものであり、急性期・慢性期の脳梗塞(脳血栓・脳

血栓) のみならず脳出血・クモ膜下出血の急性期や慢性期あるいは一過性脳虚血発作に対しても、神経保護薬として利用することができる。すなわち出血傾向を助長しないジンセノサイドRb₁は脳卒中が疑われる患者に対して救急車の中でも点滴静注が可能な薬物である。また、ジンセノサイドRb₁を血栓溶解療法を実施する前の脳梗塞患者に投与することにより、患者の予後が改善する。

それに加えて本発明のジンセノサイドRb₁は最長28日間の静脈内投与により、脳梗塞病変を1/4程度に縮小するのみならず特に虚血巣周辺部 (ischemic penumbra) で破綻・減少した血管網をほぼ正常状態にまで復することができる。従って、ジンセノサイドRb₁の静脈内投与は脳卒中後に破綻あるいは減少した脳血管網の再生・再構築を促進することにより、同薬剤の静脈内投与終了後もひとたび救済された脳組織が時間を経過しても正常に機能することができると思われる。すなわち、本発明のジンセノサイドRb₁は、Bcl-x_L蛋白の発現増強ならびにアポトーシス様神経細胞死抑止という神経細胞への直接的な保護効果に加えて、脳血管網の再生・再構築というより間接的かつ長期的に起きる防御機構を介して、障害を受けた脳を守ることが期待される。このように、脳梗塞発症後の静脈内投与により、急性期のみならず発症後1ヶ月目においても脳梗塞病変を4分の1程度にまで縮小せしめる化合物としては、ジンセノサイドRb₁が人類史上最初のもと考えられる。従って、今後ジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物をリード化合物として、様々な脳細胞又は神経細胞保護剤が作成できる。

一般臨床の場合は、脳卒中後に新たな発作がないにもかかわらず高次神経機能が持続的に低下し、いわゆる脳卒中後遺症状が悪化の一途をたどる症例があとを絶たない。その理由の1つとして脳卒中発作で破綻・減少した脳血管網の再生や再構築が時として不十分なことがあげられる。このような脳卒中後遺症状の改善のために、ジンセノサイドRb₁の静脈内投与もしくは点鼻投与が著効を示すことが期待される。

また、本発明のジンセノサイドRb₁静脈内投与は血管の再生・再構築という新規な効果・効能を示す故、血流障害を主症状とする疾病 (大動脈炎症候群、急性末梢動脈閉塞症、閉塞性血栓血管炎、閉塞性動脈硬化症、レイノー病、レイノー

症候群等)に効能を示す可能性がある。もちろんこれらの血流障害を主症状とする疾病において、血流障害にさらされた当該組織における細胞死を抑止することもジンセノサイドRb₁の忘れてはならない効能である。従って、末梢組織の血流障害においてもジンセノサイドRb₁は少なくとも2つの作用機構を介して、組織障害を軽減することが期待される。

ジンセノサイドRb₁からなる医薬組成物は一次神経病変とシナプス連絡を有する脳の領域における二次病変を抑止するので、多くの神経変性疾患(アルツハイマー病、ピック病、脊髄小脳変性症、パーキンソン病、舞蹈病、ポリグルタミン病、筋萎縮性側索硬化症、多発性硬化症等)の二次病変にも効能を示し、これらの疾病による高次神経機能障害の進行を緩らげ患者のQOL(生活の質、Quality of Life)を高めることが期待される。もちろん、特願平10-365560号及びPCT/JP99/02550(「ジンセノサイドRb₁からなる脳細胞又は神経細胞保護剤」)に記述されたごとく、アポトーシス様神経細胞死抑止効果、Bcl-x_L発現増強効果を介して、これら神経変性疾患の一次病変にも効果を発揮することが考えられる。

さらに、本発明のジンセノサイドRb₁静脈内投与は脊髄損傷動物の麻痺を著しく改善する。周知のごとく、神経組織は他の末梢組織に比べて外傷に対して最も脆弱な組織であるので、ジンセノサイドRb₁からなる医薬組成物が脊髄損傷の治療・処置に著効を示すという事実は、ジンセノサイドRb₁が中枢神経組織以外の末梢組織の外傷にも有効であることを物語っている。後述の実施例4に示すごとく、下位胸髄に圧負荷を加えられた脊髄損傷ラットは、損傷後にジンセノサイドRb₁を静脈内投与することにより両下肢麻痺(対麻痺)が改善し立ち上がることが可能となる。生理食塩水(すなわち媒体(vehicle))のみを投与された脊髄損傷ラットは両下肢の麻痺をきたしたままで、まったく立ち上がることができなかった。また、現在脊髄損傷治療薬として用いられているソルメドロール(メチルプレドニゾロン)を静脈内投与しても、脊髄損傷ラットの両下肢麻痺(対麻痺)を改善することはできなかった。これらのことから判断すると、ジンセノサイドRb₁の脊髄損傷治療効果は歴史上最強のものと考えられる。従って、今後ジンセ

ノサイド Rb₁もしくはその代謝産物をリード化合物として使用することにより、さらに様々な脊髄損傷ならびに神経外傷・外傷治療薬が開発されるものと期待される。

さらに、本発明のジンセノサイド Rb₁の薬剤としての特徴で、見逃せないのが、これと言った副作用を示さない点である。たとえば特願平10-365560号及びPCT/JP99/02550（「ジンセノサイド Rb₁からなる脳細胞又は神経細胞保護剤」）に記述されたごとく、一酸化窒素供与体であるニトロプルシッドナトリウム（SNP）処理をしていない通常の培養神経細胞にジンセノサイド Rb₁を添加しても代謝活性にまったく影響を与えず、SNP処理をして傷害を受けた神経細胞のみを低濃度（1～100 fg/ml）のジンセノサイド Rb₁が保護するので、ジンセノサイド Rb₁は正常な神経組織の機能にはあまり影響を与えず、病変部にのみ好ましい効果を発揮することができる。この点は神経保護薬として開発途上にあるグルタミン酸受容体拮抗薬よりもはるかに優れた特性といえる。

また、ジンセノサイド Rb₁の脳室内投与により脳温、脳血流、血圧にも影響が及ばないこともすでに報告されている（Lim J.-H. et al., Neurosci. Res., 28, 191-200, 1997; Zhang B. et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998）。発明者らはジンセノサイド Rb₁の60 µg/日の静脈内注入によっても、脳血流に変化が生じないことを確認している。また、ジンセノサイド Rb₁が出血傾向を助長しないことも知られている。もちろん、本発明者らが、今回の各実験例において、本発明のジンセノサイド Rb₁を投与した動物を注意深く観察した範囲内でも、副作用は検出されなかった。

特願平10-365560号及びPCT/JP99/02550（「ジンセノサイド Rb₁からなる脳細胞又は神経細胞保護剤」）で記載されたごとく、ジンセノサイド Rb₁は中大脳動脈皮質枝（MCA）永久閉塞ラット（体重約300 g）において、1日量6 µgおよび60 µgの静脈内投与で脳梗塞巣を縮小せしめ、場所学習障害（脳血管性痴呆）を改善する。しかも本発明のジンセノサイド Rb

は、同じ投与量でMCA永久閉塞ラットの虚血巣周辺部 (ischemic penumbra) における脳血管の再生・再構築を促進し、大脳皮質梗塞巣 (一次病変) の縮小に加えて視床の二次病変 (変性) を顕著に抑止する。また、脊髄損傷ラット (下位胸髄損傷ラット) に対しては、1日量 $60 \mu\text{g}$ もしくは $12 \mu\text{g}$ のジンセノサイドRb₁ 静脈内投与で麻痺の程度が顕著に改善する。

このような実験結果に基づけば、体重 60 kg のヒト脳卒中患者の静脈内への至適薬物投与量は、体重当たりで計算すると1日当たり 1.2 mg から 12 mg ということになる。従って本発明の医薬組成物のヒト脳卒中患者あるいは脊髄損傷患者での1日当たりの投与量としては、患者の個人差や病状にもよるが、 0.1 mg 以上、好ましくは 1 mg 以上、より好ましくは 10 mg 以上である。しかし、一般に動物の体重が増加するにつれて体重当たりの必要薬物投与量が減少することから、ヒトでは、この用量の $1/10$ 以下でも充分効能を示す可能性がある。ジンセノサイドRb₁ を脳神経疾患以外の疾病の予防・治療・処置に使用する時は、前述の投与量と同等もしくはその $1/10$ から $1/100$, 000 程度の投与量を選択することが好ましい。本発明の医薬組成物は副作用が少なく、投与量の上限としてはかなり多量にすることもできるが、1日当たり 1 g 以下、好ましくは 0.1 g 以下である。

本発明の医薬組成物の投与方法としては、血管内投与特に静脈内投与が好ましく、前記した投与量を断続的又は連続的に投与することができる。本発明の有効成分であるジンセノサイドRb₁ はサポニンの1種であり、通常の方法により製剤化することができる。例えば、本発明の水溶性医薬組成物は、凍結乾燥結晶を生理食塩水、蒸留水、リン酸緩衝液、ブドウ糖液等に溶解することにより静脈内投与製剤とすることができる。脂肪乳剤、リポソーム製剤としても使用可能である。静脈内投与するときの製剤の濃度としては余り高濃度でない限り任意の濃度に調整することができ、例えば $0.01 \sim 10 \text{ mg/ml}$ 、好ましくは $0.1 \sim 1 \text{ mg/ml}$ 程度にして投与することができる。

また、本発明における動物実験においては、左中大脳動脈皮質枝 (MCA) 永久閉塞後28日間にわたって、ジンセノサイドRb₁ を静脈内へ持続注入したが実際の急性期脳卒中症例では、発症後何の治療も施さなければ2週間以内に虚血巣

周辺部 (ischemic penumbra) における脳血管の破綻・脱落・退縮が急速に進行した結果脳梗塞巣が拡大し、一次病変に続く二次病変も非可逆的な状態になるので、この期間内だけでもジンセノサイド R b₁ を投与すれば、破綻した虚血巣周辺部血管網の再生・再構築ならびに二次病変抑止に役立てることができる。

本発明はジンセノサイド R b₁ の静脈内投与により、破綻・減少した脳血管が再生・再構築することを世界に先がけて報告するものである。脳血管の再生・再構築を促進するということは、ジンセノサイド R b₁ が単に神経組織の血管のみならず末梢組織における血管の再生や再構築にも有効であることを物語っている。すなわち、心筋梗塞、狭心症、大動脈炎症候群、急性末梢動脈閉塞症、閉塞性血栓性血管炎、閉塞性動脈硬化症、レイノー病、レイノー症候群等にジンセノサイド R b₁ が効能を示すことが期待される。心筋梗塞を例にとってこのことを少し詳しく説明すると、冠状動脈が永久閉塞して万一再開通されない場合、永久閉塞した冠状動脈でのみ栄養される心筋細胞は壊死に陥る。

しかし、その周辺で他の冠状動脈からの血液供給をわずかながらも受ける心筋細胞は、ジンセノサイド R b₁ の静脈内投与により、まず細胞死抑制遺伝子 B c l - x_L の発現を介して生き残り (特願平 10-365560 号、PCT/JP/02550、いずれも「ジンセノサイド R b₁ からなる脳細胞又は神経細胞保護剤」)、その後さらに同部で血管の再生・再構築が起こった結果、永久的に細胞死を免れることになる。すなわち、ジンセノサイド R b₁ は不幸にして冠状動脈のバイパス手術や P T C A (percutaneous transluminal coronary angioplasty) が施されなかった患者に対しても、少なくとも 2 つの異なる作用を介して虚血心筋を保護し、ひいては心筋梗塞巣の縮小に役立つものと期待される。もちろん、心筋梗塞を発症した患者に冠状動脈バイパス手術や P T C A を施す前にジンセノサイド R b₁ を静脈内投与しておけば、患者の予後は著しく改善する。しかも、これら末梢組織の疾患に対しては、神経疾患に使用される用量と同量もしくはその 1/10 から 1/100, 000 程度の量のジンセノサイド R b₁ で効果・効能が発揮されると思われる。

また、この際忘れてはならないのは、心筋梗塞患者では多くの場合心臓のボン

ブ機能が低下し、脳循環血液量が減少するため、脳に非可逆的な障害が生じる可能性があることである。ジンセノサイドRb₁の静脈内投与は、特願平10—365560号及びPCT/JP99/02550（「ジンセノサイドRb₁からなる脳細胞又は神経細胞保護剤」）に記載されたごとく、血流不全にさらされた脳の神経細胞を保護するので、これによりさらに心筋梗塞患者のQOL（生活の質、Quality of Life）改善に役立つ。

次に本発明のジンセノサイドRb₁静脈内投与の作用について詳細に説明する。

まず、本発明者らは、ジンセノサイドRb₁の静脈内注入による作用を検討した。このために、例えば、12～13週齢の雄性SH-SPラット（体重250～300g）を使用した。同動物は12時間ごとの明暗サイクル室で飼育し、水ならびに餌は自由摂取とした。吸入麻酔下で同動物の左中大脳動脈皮質枝（MCA）を凝固・切離した。ジンセノサイドRb₁をMCA永久閉塞直後に単回静脈内注入し（6 μ gまたは60 μ g）、その後アルザミニ浸透圧ポンプを用いて28日間静脈内へ持続注入（6 μ g/日または60 μ g/日）した。

なお、MCAを閉塞した対照動物（虚血コントロール動物）と、偽手術をした動物には同量の生理食塩水のみを投与した。

MCA永久閉塞後、発明者ら（阪中、田中）の方法に従って（Igase, K. et al., J. Cereb. Blood Flow Metab., 19, 298-306, 1999; Zhang B., et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998）2週目と4週目にそれぞれ4日間水迷路テストを実施し、SH-SPラットの場所学習能力を判定した。

その結果を第1図に示す。第1図の左側は2週目の結果であり、同右側は4週目の結果である。また、第1図中の黒丸印は偽手術をしたラットのものであり、白丸印は手術後、生理食塩水のみを投与したものであり、黒四角印はジンセノサイドRb₁を6 μ g/日投与したものであり、白四角印はジンセノサイドRb₁を60 μ g/日投与したものである。

第1図のごとくMCA永久閉塞後（脳梗塞後）の場所学習障害が、ジンセノサイドRb₁注入脳梗塞群において生理食塩水注入脳梗塞群に比べて有意に改善された。特に、MCA閉塞後2週目と4週目の水迷路テストで、ジンセノサイドRb

の低用量では各々3日目と4日目の試行において、ジンセノサイドRb₁の高用量では2週目の4日目および4週目の3日目、4日目に有意な学習能力改善効果を示した。また、4週目の初日にも高用量・低用量とも有意な効果が確認された。なお、SH-SPLラットの泳水速度には各群で有意差はみられなかった。

4週目の水迷路テスト終了後に、SH-SPLラットを抱水クロラルにて麻酔し、4%パラホルムアルデヒドを含有する0.1Mリン酸緩衝液で経心的に灌流固定した。その後、同動物の脳を摘出し大脳皮質梗塞巣の写真を撮影した。左大脳半球面積と左大脳皮質梗塞面積を、写真上で画像解析装置を用いて計測し、左大脳皮質梗塞面積を左大脳半球面積で除することにより大脳皮質梗塞比率(%)を算出した。その結果を第2図に示す。

第2図に示されるごとく、ジンセノサイドRb₁静脈内投与脳梗塞群で生理食塩水投与脳梗塞群に比して、大脳皮質梗塞比率も有意に減少していた。この大脳皮質梗塞比率は梗塞面積をもとに算出したものであるが、その比率の平均値がジンセノサイドRb₁静脈内投与群で生理食塩水投与群の50%程度あるいはそれ以下に低下していることから、実際の脳梗塞体積は、ジンセノサイドRb₁の静脈内投与により約4分の1程度に縮小したことになる。

第3図Aに生理食塩水投与脳梗塞巣、第3図BにジンセノサイドRb₁(6μg/日)投与脳梗塞巣の実例を示す。

また、第4図に本実験結果をまとめた模式図を示す。生理食塩水投与群では脳梗塞病巣部の大きさが大きいままであり、水迷路テストにおいては目的のプラットホームに到達するまでに長時間を要しているのに対して、本発明のジンセノサイドRb₁投与群においては病巣部が回復、縮小されており、この結果水迷路テストにおいては目的のプラットホームに短時間で到達している。

スナネズミの一過性前脳虚血モデルを用いた従来の発明者(阪中)の論文(We n T.-C. et al., Acta Neuropathol., 91, 15-22, 1996)では、ジンセノサイドRb₁の腹腔内投与(10mg/kg/日または20mg/kg/日)を虚血負荷前に実施しても、約30%の海馬CA1錐体神経細胞しか救うことができなかった。もちろん、ジンセノサイドRb₁をスナネズミ腹腔内に虚血後に投与してもまったく効果はなかった。しかも、腹腔内投与されたジンセノサイドRb₁の一日量

は、スナネズミの体重（70 g 前後）から判断すると、0.7 mg から 1.4 mg という高用量であるので、ジンセノサイド R b₁ の投与効率・効能という観点から判断しても、ジンセノサイド R b₁ の静脈内投与は腹腔内投与よりもはるかに優れた投与方法であり、ヒトへの応用が容易である。周知のごとく、ヒトで薬物を腹腔内に投与する方法はごく一部の例外（腹膜灌流等）を除いてはほとんど実施されていない。

また、本実施例に用いた M C A 永久閉塞動物（脳梗塞ラットもしくは脳塞栓ラット）は明らかに、スナネズミの一過性前脳虚血モデルよりも重篤でありかつヒトの病態に近いモデルである。従って、この M C A 永久閉塞動物において、ジンセノサイド R b₁ を脳血管閉塞後に静脈内投与して著効を示したということは、ジンセノサイド R b₁ 少量静脈内注入の有用性、利便性、経済性を明らかにしている。

一方、M C A 永久閉塞動物の脳室内に直接ジンセノサイド R b₁ を注入してその効果を調べた従来の発明者ら（阪中、田中）の論文では（Zhang B. et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998）、M C A 閉塞後に 0.6 μ g / 日の用量でジンセノサイド R b₁ を脳室内へ持続注入したときのみ有意な脳梗塞抑止効果がみられたが、その結果は本実施例で示したジンセノサイド R b₁ 静脈内投与の効果と同等ないしそれより少し劣るものであった。また、ジンセノサイド R b₁ 脳室内投与についての前掲の論文において、その他の用量（6 μ g / 日、0.06 μ g / 日）で M C A 永久閉塞後にジンセノサイド R b₁ を脳室内へ持続注入してもまったく脳梗塞抑止効果はみられなかったため、ジンセノサイド R b₁ 脳室内投与の有効濃度域は極めて狭く、実用化は困難と考えられた。しかも、ヒトへの応用を考慮したとき、ジンセノサイド R b₁ の脳室内注入はその危険性と効能を斟酌した場合、現実的に実施することは不可能と判断される。

一般に、神経保護因子は脳室内あるいは脳実質内に直接投与した場合にもっとも大きな効果を発揮し、静脈内投与や腹腔内投与をした場合には、脳血液関門に遮断されたり、代謝分解を受けてその効果・効能が激減あるいは消失すると考えられる。従って、ジンセノサイド R b₁ に関して、その腹腔内投与や脳室内投与実験結果から判断して、静脈内投与の効果・効能はまったく予想されていなかった。

しかし、本実験例で明らかにされたごとく、ジンセノサイドRb₁の静脈内投与は脳室内投与の場合よりも広い濃度域でMCA永久閉塞ラットの脳梗塞巣をより効果的に縮小せしめ、同動物の学習能力を改善することが発明された。また、ジンセノサイドRb₁は薬用人参中に含有される精製サボニンであるが、経口投与により血中ではまったく検出されないため事実上ジンセノサイドRb₁自体の薬理作用は否定されてきた（小橋ら、薬用人参'95、pp213-221、熊谷 朗編、共立出版株式会社）。従って、本実施例により特願平10-365560号及びPCT/JP99/02550（「ジンセノサイドRb₁からなる脳細胞又は神経細胞保護剤」）に記述されたごとく、静脈内投与されたジンセノサイドRb₁が薬用人参とは独立した効果・効能・用途をもつことが明らかにされた。

次に発明者らは、ブレグマ（bregma）後方2.8mm前後のレベルの脳から5μm厚のパラフィン切片を作成し、ジンセノサイドRb₁静脈内投与群の頭頂葉梗塞巣周辺部（すなわちジンセノサイドRb₁投与により救済された脳組織）（第5図）における1.27mm²あたりの血管面積を大脳半球ごとに4枚の微分干渉顕微鏡写真を用いて測定し（第6図）、血管面積率を算出した（表1）。

表 1

	健常側 (%)	虚血側 (%)
Rb ₁ : 6 μg/日	7.0 ± 0.64	8.0 ± 0.58
Rb ₁ : 60 μg/日	8.3 ± 0.92	9.0 ± 0.52

また、対照側（健常側）でも同様の血管面積率を測定した。表1はジンセノサイドRb₁ 6 μg/日および60 μg/日投与群の脳血管面積率を健常側と虚血側で比較する表である。データは平均値±標準誤差で示されており、統計解析法はANOVA+ FisherのPLSDによっている。表1に示したごとく、血管面積率は対照側、虚血側で有意差はみられなかった。このことはMCA永久閉

塞後28日以内のジンセノサイドRb₁静脈内注入により、虚血巣周辺部 (ischemic penumbra) の大脳皮質血管網がほぼ再生・再構築されたことを物語っている。ちなみに、MCA永久閉塞直後の頭頂葉梗塞巣周辺部は当然のことながら健常側に比べて血管面積率が著しく低下する。

また、ブレグマ (bregma) 後方3.6mmのレベルのバラフィン切片にニッスル染色を施し、同レベルにおける左右視床の面積比 (虚血側/健側×100) を測定したところ、ジンセノサイドRb₁投与群でvehicle (生理食塩水) 投与虚血群に比して有意に高くなっており、ほぼ偽手術群と近似した値になっていた。このことは大脳皮質梗塞後に生じる視床の二次性萎縮が、ジンセノサイドRb₁の静脈内投与によりほぼ完全に抑止されたことを示している。さらに、発明者らは大脳皮質の虚血中心部 (ischemic core) と密接なシナプス連絡 (線維連絡) を有する視床腹側後側核 (視床VP核) の組織像を調べた。第7図Aは偽手術動物の視床VP核を、第7図Bは生理食塩水投与虚血動物の視床VP核を、第7図CはジンセノサイドRb₁ (60 μg/日) 投与虚血動物の視床VP核を、それぞれ示す。vehicle (生理食塩水) 注入虚血群 (第7図B) に比べて、ジンセノサイドRb₁静脈内投与虚血群 (第7図C) で、有意に神経細胞が二次変性を免れて多数残存していた。従って、ジンセノサイドRb₁は静脈内投与により、視床二次変性を抑止することが判明した。

次に発明者らは、神経組織の二次変性をきたす難治性疾患として脊髄損傷を取りあげ、ジンセノサイドRb₁静脈内投与の効果を調べた。脊髄のある分節たとえば下位胸髄に圧負荷が加わると、同部の灰白質神経細胞のみならず同部の白質伝導路が障害を受ける。白質伝導路の障害はさらに遠位部 (尾側) へと進展し、かつ伝導路の起始細胞すなわち伝導路に線維を投射している上位の神経細胞体 (すなわち起始細胞) の二次変性をもたらす。このようにして、圧負荷を受けた下位胸髄の白質伝導路の障害は、伝導路の起始細胞体 (神経細胞体) ならびに下位胸髄以下 (すなわち腰髄、仙髄) の伝導路の二次変性を惹起することにより、両下肢の対麻痺を引き起こす。また、下位胸髄の損傷により、腰髄・仙髄に対する上位の脳からの神経支配が途絶えるため、さらに腰髄・仙髄の灰白質でも神経細胞

の二次変性が進行し、両下肢の対麻痺が回復不能となるものと思われる。発明者らは、このような脊髄損傷のモデルとして、下位胸髄に20 gの圧力を20分間負荷されたウイスターラット（体重約300 g）を用いた。

ハロセン、笑気による吸入麻酔下で、ラットの下位胸髄に20 gの圧力を20分間負荷した後、30分以上経過してから左大腿静脈にジンセノサイドRb₁（12 μ gまたは60 μ g）を単回注入し、さらに同静脈へジンセノサイドRb₁（12 μ g／日または60 μ g／日）をアルザミニ浸透圧ポンプにて7日間持続投与した。対照動物ならびに偽手術動物には同様のスケジュールで同量の生理食塩水（vehicle、媒体）を投与した。脊髄損傷前、脊髄損傷当日、脊髄損傷後1日目から7日目まで、各ラットのOpen field locomotor scores (Basso, Bettie and Bresnakan (BBB) scores)を計測して運動能力の指標とした (Basso D.M. et al., J. Neurotrauma, 13, 343-359, 1996)。ちなみに偽手術ラット（正常ラット）のBBB scores (BBBスコア)は20ないし21である。

第8図Aは脊髄損傷後2日目の生理食塩水投与ラットを、第8図Bは脊髄損傷後2日目のジンセノサイドRb₁（60 μ g／日）投与ラットを、それぞれ示している。第8図Aに示すごとく、下位胸髄に20 gの圧力を20分間負荷された生理食塩水投与ラットは明らかに両下肢の対麻痺を呈する。しかし下位胸髄に20 gの圧力を20分間負荷したのちにジンセノサイドRb₁（60 μ g／日）を静脈内投与すると、第8図Bに示すごとく2日後には、両下肢の対麻痺が著しく改善し、ラットは物につかまりながら立ち上がることができるようになる。

脊髄損傷後7日目のBBBスコア (scores) にてラットの運動能力を定量化したグラフのみを第9図に示す。第9図に示すごとく、脊髄損傷ラットの運動能力はジンセノサイドRb₁静脈内投与の用量に依存して有意に改善した。データは平均値±標準誤差で示されており、統計解析法はMann-Whitney Uテストによっている。

なお、脊髄損傷治療薬として現在臨床現場で使用されているソルメドロール（メチルブレドニゾン）を30 mg/kgの用量で発明者らが作成した脊髄損傷ラットの大腿静脈にジンセノサイドRb₁を投与する場合と同様のスケジュールで静脈内投与しても有意な麻痺改善効果はみられなかった。また、ソルメドロー

ル投与ラットでは、背部の手術創の治癒が生理食塩水投与ラットに比べて明らかに遅延したが、ジンセノサイドR b₁投与ラットではそのような副作用は認められなかった。このことは、ジンセノサイドR b₁が脊髄損傷・神経外傷治療薬としてはソルメドロールよりも優れた特性を有していることを物語っている。しかも、ジンセノサイドR b₁の投与量はソルメドロールの投与量よりもはるかに少なく、さらにジンセノサイドR b₁はソルメドロールのような免疫機能抑制作用や消化性潰瘍誘発作用を有していないので、極めて安全な脊髄損傷・神経外傷治療薬となることが期待される。

脊髄損傷ラットを用いた本実験結果より、ジンセノサイドR b₁からなる静脈内投与製剤の脊髄損傷治療効果は歴史上最強のものと考えられる。おそらくジンセノサイドR b₁もしくはその代謝産物が極めて強力な脊髄損傷治療作用を発揮するものと思われるが、このことはジンセノサイドR b₁もしくはその代謝産物が脊髄損傷・神経外傷治療のためのリード化合物になり得ることも支持している。本実験結果は、さらにジンセノサイドR b₁が脊髄損傷後の神経組織二次変性をも抑止することを支持している。

また、周知のごとく神経組織は他の末梢組織に比べて外傷に対して最も脆弱な組織であるので、ジンセノサイドR b₁からなる医薬組成物が脊髄損傷の治療・処置に著効を示すという事実は、ジンセノサイドR b₁が中枢神経組織以外の組織すなわち末梢組織の外傷にも有効であることを物語っている。

このようにジンセノサイドR b₁の脊髄損傷・神経外傷治療効果は画期的なものであるので、ジンセノサイドR b₁もしくはその代謝産物をリード化合物として新規脊髄損傷・神経外傷治療薬を合成できるのみならず、ジンセノサイドR b₁もしくはその代謝産物の標的分子を同定することにより、標的分子の機能を修飾する新規化合物をも合成して脊髄損傷・神経外傷・外傷治療薬の開発を目指すことができる。

また、脊髄損傷においては、グリア細胞のうちでも特にオリゴデンドロサイトが傷害を受けてアポトーシスに陥った結果、脱髄現象が起こり神経症状が悪化・進行すると報告されている (Crowe, M. J. et al., Nature Med. 3, 73-76, 1997; Emery, E. et al., J. Neurosurg. 89, 911-920, 1998)。ジンセノサイドR

b₁の静脈内投与が顕著に脊髄損傷ラットの両下肢麻痺を改善するという実験結果は、ジンセノサイドR b₁がオリゴデンドロサイトのアポトーシスもしくはアポトーシス様神経細胞死を抑止することにより、脊髄損傷の症状を改善することを物語っている。従って、本発明のジンセノサイドR b₁はオリゴデンドロサイトを保護することにより、脱髄をきたす脳神経疾患（多発性硬化症、ヒンスワンガー病等）の予防・治療・処置にも有効であると考えられる。さらに、ジンセノサイドR b₁の静脈内投与が脊髄損傷ラットの両下肢麻痺（対麻痺）を改善するという実験結果は、損傷を受けた神経線維もしくは神経組織がジンセノサイドR b₁投与により再生することも示唆している。

以上の実験結果から、ジンセノサイドR b₁又はその塩を含有してなる静脈内投与用製剤が脳卒中病変で破綻あるいは減少した脳血管網を再生・再構築せしめ、その脳細胞（グリア細胞を含む）保護作用又は神経細胞保護作用（特願平10—365560号、PCT/JP99/02550、いずれも「ジンセノサイドR b₁からなる脳細胞又は神経細胞保護剤」とあいまって、脳組織を保護することが明らかになった。また、ジンセノサイドR b₁又はその塩を含有してなる静脈内投与用製剤が神経組織の一次病変のみならず、一次病変とシナプス連絡（線維連絡）を有する脳領域の二次病変をも抑止することが明らかにされた。さらに、ジンセノサイドR b₁からなる医薬組成物は脊髄損傷・神経外傷の画期的治療薬となるのみならず末梢組織の外傷にも効果・効能を示すことが期待される。

本発明で使用するジンセノサイドR b₁又はその塩は、薬用人参の成分として知られており、副作用の極めて少ない物質である。

実施例

次に、具体的な試験例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの具体例に限定されるものではない。

実施例1（ジンセノサイドR b₁静脈内注入実験）

12～13週齢の雄性SH-SPLラット（脳卒中易発症高血圧自然発症ラット、体重250～300g）を使用した。同動物は12時間ごとの明暗サイクル室で

飼育し、水ならびに餌は自由摂取とした。同動物の血圧は 203.1 ± 6.9 mmHg であり、以下の実験は愛媛大学医学部附属動物実験施設の動物実験指針に則ってなされた。吸入麻酔下で直腸温を 37 ± 0.2 °C に維持した SH-S P ラットの左中大脳動脈皮質枝 (MCA) を凝固・切離した。

MCA 永久閉塞の直後に左大腿静脈からジンセノサイド Rb₁ の生理食塩水溶解液 ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ または $0.1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) を $60 \mu\text{l}$ (ジンセノサイド Rb₁ として $60 \mu\text{g}$ または $6 \mu\text{g}$) 単回注入した。その後、背部皮下に埋めたアルザミニ浸透圧ポンプと連結するカテーテルを、ジンセノサイド Rb₁ 単回注入部位から左大腿静脈に挿入・留置した。あらかじめ、同ミニ浸透圧ポンプには、ジンセノサイド Rb₁ の生理食塩水溶解液を満たしておき、ジンセノサイド Rb₁ $60 \mu\text{g}/\text{日}$ または $6 \mu\text{g}/\text{日}$ の用量で左大腿静脈から 28 日間持続注入した。なお、ジンセノサイド Rb₁ 溶解液の流量は $0.25 \mu\text{l}/\text{時}$ であった。MCA を永久閉塞した対照動物 (虚血コントロール動物) と偽手術動物には同量の生理食塩水のみを投与した。

実施例 2 (水迷路テスト)

MCA 永久閉塞後、発明者ら (阪中、田中) の方法に従って (Igase, K. et al., J. Cereb. Blood Flow Metab., 19, 298-306, 1999; Zhang B., et al., J. Stroke Cerebrovasc. Dis., 7, 1-9, 1998) 2 週目と 4 週目にそれぞれ 4 日間水迷路テストを実施し、SH-S P ラットの場所学習能力を判定した。

その結果を第 1 図に示す。第 1 図の左側は 2 週目の結果であり、同右側は 4 週目の結果である。また、第 1 図中の黒丸印 (●) は偽手術をしたラットのものであり、白丸印 (○) は手術後、生理食塩水のみを投与したものであり、黒四角印 (■) はジンセノサイド Rb₁ を $6 \mu\text{g}/\text{日}$ 投与したものであり、白四角印 (□) はジンセノサイド Rb₁ を $60 \mu\text{g}/\text{日}$ 投与したものである。データは平均値 ± 標準誤差で示されており、統計解析法は ANOVA + Fisher の PLSD によっている。

なお、SH-S P ラットの水泳速度には各群で有意差はみられなかった。

実施例 3 (病巣部比率測定)

4週目の水迷路テスト終了後に、SH-SPラットを抱水クロラルにて麻酔し、4%パラホルムアルデヒドを含有する0.1Mリン酸緩衝液で経心的に灌流固定した。その後、同動物の脳を摘出し大脳皮質梗塞巣の写真を撮影した。左大脳半球面積と左大脳皮質梗塞面積を、写真上で画像解析装置を用いて計測し、左大脳皮質梗塞面積を左大脳半球面積で除することにより大脳皮質梗塞比率(%)を算出した。その結果を第2図に示す。データは平均値±標準誤差で示されており、統計解析法はMann-Whitney Uテストによっている。

第3図Aに生理食塩水投与脑梗塞巣、第3図BにジンセノサイドRb₁(6μg/日)投与脑梗塞巣の実例を示す。

また、第4図に本実験結果をまとめた模式図を示す。生理食塩水投与群では脑梗塞病巣部の大きさが大きいままであり、水迷路テストにおいて目的のプラットホームに到着するまでに長時間を要しているのに対して、本発明のジンセノサイドRb₁投与群においては病巣部が回復、縮小されており、この結果水迷路テストにおいては目的のプラットホームに短時間で到着している。

次に摘出脳をパラフィンに包埋し、ブレグマ(Bregma)後方2.8mm前後のレベルで大脳皮質梗塞巣を含む5μm厚のパラフィン切片を作成した。ジンセノサイドRb₁静脈内投与群の頭頂葉梗塞巣周辺部、すなわちジンセノサイドRb₁投与により救済された虚血巣周辺部の脳組織(第5図)における1.27mm²あたりの血管面積を大脳半球ごとに4枚の微分干渉顕微鏡写真を用いて測定し(第6図)、血管面積率を算出した(表1)。また、健常側(対照側)でも同様の血管面積率を測定した。表1に示したごとく、血管面積率は健常側・虚血側で有意差はみられなかった。

第5図は、5μm厚脳切片に占める頭頂葉梗塞巣周辺部血管の血管面積測定部位を示したものであり、第5図の長方形で囲った部分は血管面積測定域：頭頂葉大脳皮質第II～第VI層であり、第5図の黒く塗りつぶした部分はジンセノサイドRb₁投与時の梗塞巣であり、第5図の灰白で表示した部分は生理食塩水投与時の梗塞巣である。

第6図は、梗塞巣周辺の大脳皮質および健常側同部位大脳皮質血管網を示した

図面に代わる写真である。上側は健常側を示しており、下側は虚血側を示している。

表 1 は、 $5\mu\text{m}$ 厚脳切片に占める頭頂葉梗塞巣周辺部血管の面積率を示し、データは平均値 \pm 標準誤差で示されており、統計解析法は ANOVA + Fisher の PLSD によっている。N は 5 である。

また、ブレグマ (Bregma) 後方 3.6mm のレベルのバラフィン切片にニッスル染色を施し、同レベルにおける左右視床の面積比 (虚血側/健常側 $\times 100$) を測定したところ、ジンセノサイド Rb₁ 投与虚血群で vehicle (生理食塩水) 投与虚血群に比して、有意に高くなっておりほぼ偽手術群と近似した値になっていた。

結果を表 2 に示す。

表 2

	n	面積比 (%)	神経細胞数
生理食塩水	8	86.4 ± 8.1	10.1 ± 5.5
Rb ₁ : $6\mu\text{g}/\text{日}$	5	$95.9 \pm 3.3^*$	$30.6 \pm 2.9^{**}$
Rb ₁ : $60\mu\text{g}/\text{日}$	8	$95.3 \pm 2.4^*$	$31.5 \pm 3.6^{**}$
偽手術群	8	98.8 ± 5.3	58.5 ± 4.7

表 2 は、視床左右面積比と視床腹側後側核 0.099mm^2 あたりの神経細胞数を示し、データは平均値 \pm 標準誤差で示されており、統計解析法は Mann-Whitney U テストによっている。表 2 中の * は $P < 0.05$ であることを示し、** は $P < 0.01$ であることを示す。さらに、虚血中心部 (ischemic core) と密接なシナプス連絡 (線維連絡) を有する視床腹側後側核 (視床 VP 核) においても、vehicle (生理食塩水) 注入虚血群に比べて、ジンセノサイド Rb₁ 静脈内投与虚血群で、有意に神経細胞が二次変性を免れて多数生存していた。

実施例 4 (脊髄損傷ラットに対するジンセノサイド Rb₁ 静脈内投与の効果)

ハロセン、笑気による吸入麻酔下で、ラットの下位胸髄に 20g の圧力を 20

分間負荷した後、30分以上経過してから左大腿静脈にジンセノサイドRb₁ (12 μ g または 60 μ g) を単回注入し、さらに同静脈へジンセノサイドRb₁ (12 μ g/日 または 60 μ g/日) をアルザミニ浸透圧ポンプにて7日間持続投与した。対照動物ならびに偽手術動物には同様のスケジュールで同量の生理食塩水 (媒体 (vehicle)) を投与した。脊髄損傷前、脊髄損傷当日、脊髄損傷後1日目から7日目まで、各ラットのオープン・フィールド・ロコモーター・スコアズ (Open field locomotor scores: Basso, Beattie and Bresnakan (BBB) scores) を計測して運動能力の指標とした (Basso D.M. et al., J. Neurotrauma, 13, 343-359, 1996)。

第8図Aは脊髄損傷後2日目の生理食塩水投与ラットを、第8図Bは脊髄損傷後2日目のジンセノサイドRb₁ (60 μ g/日) 投与ラットを、それぞれ示している。第8図Aに示すごとく、下位胸髄に20gの圧力を20分間負荷された生理食塩水投与ラットは明らかに両下肢の対麻痺を呈する。しかし下位胸髄に20gの圧力を20分間負荷したのちにジンセノサイドRb₁ (60 μ g/日) を静脈内投与すると、第8図Bに示すごとく2日後には、両下肢の対麻痺が著しく改善し、ラットは物につかまりながら立ち上がることができるようになる。

脊髄損傷後7日目のBBBスコア (scores) にてラットの運動能力を定量化したグラフのみを第9図に示す。第9図に示すごとく、脊髄損傷ラットの運動能力はジンセノサイドRb₁ 静脈内投与の用量に依存して有意に改善する。データは平均値±標準誤差で示されており、統計解析法はMann-Whitney Uテストによっている。*は $P < 0.01$ を**は $P < 0.005$ を示す。

実施例5 (ジンセノサイドRb₁による褥創の予防・治療・処置)

寝たきり患者ならびに高齢者の褥創は、全身状態を悪化させるきっかけともなりQOL (生活の質、Quality of Life) を著しく損なう皮膚疾患である。褥創の早期には病変部皮膚の発赤がみられるが、この時点で病変部局所ならびにその周辺に塗布して効果・効能を示す外用剤がほとんどないことが、皮膚科領域で大きな問題となっている。

ブドウ糖を含有するか含有しない水溶性基剤あるいは脂溶性基剤にジンセノサ

イドR b₁を混入して皮膚外用剤（クリームまたは軟膏）を作成し、褥創部局所およびその周辺部に褥創病変が治癒するか縮小するかあるいは悪化しなくなるまで、常時塗布する。その際に局部におけるジンセノサイドR b₁の細胞外液濃度が1 ng/ml以下、好ましくは10 pg/ml以下、より好ましくは100 fg/ml以下となるように基剤へのジンセノサイドR b₁混入量を調整する。また、ジンセノサイドR b₁を含有する皮膚外用剤の局所塗布で十分な効果が得られなければ、ジンセノサイドR b₁の静脈内投与を併用する。

実施例6（ジンセノサイドR b₁による角膜損傷の予防・治療・処置）

コンタクトレンズ装着あるいはエキシマレーザーによる近視矯正術後に角膜損傷が生じることがよく知られているが、実際に角膜組織を保護する点眼薬はほとんどないのが現状である。

各種点眼用基液にジンセノサイドR b₁を混入して点眼薬を作成し、角膜損傷患者に連日必要回数点眼し、角膜病変が改善するまであるいは治癒するまで点眼を継続する。その際に角膜病変組織におけるジンセノサイドR b₁の細胞外液濃度が1 ng/ml以下、好ましくは10 pg/ml以下、より好ましくは100 fg/ml以下となるように基液へのジンセノサイドR b₁混入量を調整する。

実施例7（ジンセノサイドR b₁による移植用角膜の保護）

角膜移植は、移植医療の中でも最も成功率の高い治療法として眼科領域では頻繁に実施されている。しかし、遺体から角膜を採取したのち移植手術を実施するまでの間にも移植用角膜組織を構成する細胞は確実に死に至り始めるため、このことが角膜採取から移植手術までの時間を制約する最大の要因となっている。

移植用角膜を採取後、従来の角膜保存液の中にジンセノサイドR b₁を1 ng/ml以下、好ましくは10 pg/ml以下さらに好ましくは100 fg/ml以下となるように混入して移植用角膜を保護することができる。

実施例8（ジンセノサイドR b₁による舞蹈病の予防・治療・処置）

舞蹈病（ハンチントン病）は神経変性疾患の中でも代表的な単一遺伝子病とし

て知られており、ポリグルタミンをコードするCAGのくり返し配列が病因であると考えられているが、その治療法はいまだ開発されていない。舞踏病の責任遺伝子であるミュータントハンチンチン (mutant huntingtin) を線条体由来の培養神経細胞に導入 (transfection) すると、同細胞はアポトーシス様神経細胞死に陥る。しかし、ミュータントハンチンチン (mutant huntingtin) とともにBcl-x_Lを培養神経細胞に強制発現しておくと、同細胞の死がほぼ完全に抑止されることが報告されている (Saudou, F., et al., Cell, 95, 55-66, 1998)。従って特願平10-365560号及びPCT/JP99/02550 (「ジンセノサイドRb₁からなる脳細胞又は神経細胞保護剤」) で発明者らが見出したごとく、脳神経組織におけるBcl-x_L蛋白発現増強作用を有するジンセノサイドRb₁を、舞踏病発病前あるいは発病後に点鼻もしくは静脈内投与すれば、効果・効能を示す可能性が高い。また舞踏病以外のポリグルタミン病 (Machado-Joseph病、dentatorubral-pallidoluysian atrophy 等) でもジンセノサイドRb₁の点鼻もしくは静脈内投与が有効と思われる。さらに、本発明で見出されたごとく、ジンセノサイドRb₁は舞踏病の一次病変 (線条体病変) から、線条体と線維連絡を有する他の脳領域へ二次変性が進展することも阻止すると期待される。

遺伝子診断によって舞踏病あるいはその他のポリグルタミン病を将来発症することが判明したヒト (体重60kgと仮定)、あるいはすでに舞踏病もしくはその他のポリグルタミン病を発症した患者 (体重60kgと仮定) に、ジンセノサイドRb₁を適量病状が改善するかあるいは安定するまで点鼻もしくは静脈内投与する。また、ポリグルタミン病治療のためのジンセノサイドRb₁静脈内投与量は急性期脳卒中治療に要する投与量と同様である。点鼻投与については、静脈内投与されたジンセノサイドRb₁と同様の血中濃度が維持できるように、点鼻投与量を調整すればよい。

実施例9 (ジンセノサイドRb₁による拡張型心筋症の予防・治療・処置)

拡張型心筋症は原因の不明な心筋細胞死 (心筋細胞変性) の結果、心機能の低下と心拡大を呈する疾患である。心機能低下は進行性に増悪し、心不全症状を発症し、死に至る。心不全が悪化したときには、心移植以外に治療法はないと考え

られてきた。おそらく、拡張型心筋症患者の心筋細胞が死に至るときには、心筋細胞に豊富に含まれる細胞死抑制遺伝子産物 Bcl-xL 蛋白が減少するものと推測されるので、この Bcl-xL 蛋白の減少をジンセノサイド Rb₁ の静脈内投与もしくは点鼻投与によりくい止めることにより（特願平 10-365560 号、PCT/JP99/02550、いずれも「ジンセノサイド Rb₁ からなる脳細胞又は神経細胞保護剤」）、同患者の心筋細胞死を抑止することができ、ひいては同患者の心機能を長期にわたって維持することが可能になると思われる。

拡張型心筋症と診断された患者（体重 60 kg と仮定）に対して、速やかにジンセノサイド Rb₁ を適当量病状が改善するかあるいは病状の進行が止まるまで点鼻もしくは静脈内投与する。また、ジンセノサイド Rb₁ の投与と、 β -ブロッカー、カルシウム拮抗剤、ACE 阻害剤、利尿剤等の心筋症・心不全治療薬の内服とを併用することも可能である。心疾患を始めとする末梢臓器の疾病に対して、ジンセノサイド Rb₁ を投与するときは、中枢神経疾患に対する投与量と同等もしくはその 1/10 から 1/100, 000 程度の投与量を選択することが好ましい。

産業上の利用可能性

本発明は、低濃度のジンセノサイド Rb₁ の静脈内投与用製剤からなる極めて有効な、脳卒中（脳出血、クモ膜下出血、脳梗塞、脳血栓、脳塞栓、一過性脳虚血発作を含む）後の脳血管再生・再構築促進剤を提供する。すなわち、ジンセノサイド Rb₁ に関する本発明は、脳卒中が疑われる患者に対して救急車の中でも点滴静注が可能な薬物を提供するものである。実際の急性期脳卒中症例では、発症後 2 週間以内に病変が進行することが多いので、この期間内だけでも本発明のジンセノサイド Rb₁ を投与すれば充分効果が期待できる。

さらに、本発明の医薬組成物は、血管の再生・再構築という新規な効果・効能を示す故、血流障害を主症状とする疾病（大動脈炎症候群、膠原病、急性末梢動脈閉塞症、閉塞性血栓血管炎、閉塞性動脈硬化症、血栓性静脈炎、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症、網膜中心動静脈閉塞症、レイノー病、レイノー症候群、心筋梗塞、褥創、末梢循環不全、狭心症、肝・腎・心虚血再灌流障害等）に効能を示

す。もちろん、特願平10—365560号ならびにPCT/JP99/02550（「ジンセノサイドRb₁からなる脳細胞又は神経細胞保護剤」）に記載されたごとくこれらの血流障害を主症状とする疾病において、血流障害にさらされた当該組織における細胞死を抑制することもジンセノサイドRb₁の忘れてはならない効能である。従って、中枢末梢を問わず血流障害を主要症状とする疾病において、ジンセノサイドRb₁は少なくとも2つの作用機構を介して、血流障害にさらされた組織・細胞の障害を軽減する。

一般に神経疾患の一次病変が生じる原因は多種多様であることはよく知られている。たとえば、脳卒中は脳血管の破綻・閉塞・血流不全が原因であるが、神経変性疾患は遺伝子異常・環境要因・生活習慣等が複雑に絡み合った結果発症するので、個々の神経変性疾患について発病の原因をつきとめた上で、その原因を排除し、一次病変の進行をくい止めるのは必ずしも容易ではない。一方、脳卒中にしろ神経変性疾患にしろ、一次病変の原因は異なろうとも、ひとたび一次病変が形成されると、一次病変部位とシナプス連絡（線維連絡）を有するさまざまな脳領域が二次変性を起こすと言われている。おそらく、このようなシナプス連絡（線維連絡）に帰因する神経組織の二次変性には、少なくとも一部共通のメカニズムが関与することが想定される。本発明では低濃度のジンセノサイドRb₁の静脈内投与が脳皮質梗塞後に生じる視床の二次変性ならびに脊髄損傷後の神経組織二次変性を効果的に抑止したので、これらのことから判断すると、ジンセノサイドRb₁の静脈内投与もしくは点鼻投与は他の型の脳卒中一次病変（脳出血、クモ膜下出血、一過性脳虚血発作）ならびにその他の脳神経疾患の一次病変（アルツハイマー病、ピック病、脊髄小脳変性症、パーキンソン病、脱髄疾患、舞蹈病、ポリグルタミン病、脳性マヒ、筋萎縮性側索硬化症、緑内障、老人性黄斑変性症、エイズ脳症、肝性脳症、脳炎、進行性核上性麻痺、多発性硬化症、糖尿病性網膜症、糖尿病性神経症、網膜剥離、網膜色素変性症、一酸化炭素中毒、新生児仮死、末梢神経障害、痙性対麻痺、進行性核上性麻痺、脊髄血管障害、ミトコンドリア脳筋症、髄膜炎等）に続発する神経組織の二次変性の抑止などにも有効とされる。また、脊椎（腰椎）椎間板ヘルニア、脊柱管狭窄症、脊椎分離、すべり症、頸椎症、後縦靱帯骨化症に伴う脊髄や神経根の圧迫・麻痺ならびに顔面神経麻痺に対

してもジンセノサイドRb₁投与が有効である。ジンセノサイドRb₁のこれらの効果効能は神経難病に苦しむ患者の病状進行を遅らせ、QOL（生活の質、Quality of Life）を改善するのに役立つものと思われる。

ジンセノサイドRb₁は肝炎や腎炎においても急性期及び慢性期に肝細胞や腎細胞を保護することが期待されるが、それに加えて肝炎や腎炎により破綻した同臓器の血管網を再生・再構築せしめることにより、肝炎及び腎炎患者の予後を改善するものと思われる。さらにジンセノサイドRb₁は、その細胞保護作用と血管再生・再構築促進作用を介して、褥創や創傷治癒に効果・効能を発揮する。この場合ジンセノサイドRb₁は、静脈内投与剤としてのみならず外用剤や病変部局所注射剤としても使用可能である。さらに、ジンセノサイドRb₁の投与方法として、皮下注射、筋肉注射、点眼、点鼻、吸入、挿肛投与、経口投与、舌下投与、経皮投与等任意の経路が選択できる。ただし、ジンセノサイドRb₁を経口投与剤として使用する時は、ジンセノサイド単独投与では効果があまり期待できないので、消化管での分解を阻止する担体あるいは消化管での吸収を促進する担体にジンセノサイドRb₁を混入・封入又は結合させたのちに、経口投与することが必要になる。また、ジンセノサイドRb₁の代謝産物のうちジンセノサイドRb₁と同等もしくはそれ以上の効果・効能を有するものが同定されれば、ジンセノサイドRb₁の適応が期待される前述の疾病に対して、その活性代謝産物を既述の方法で投与することもできる。また本発明のジンセノサイドRb₁と高分子化合物との分散体を作成した後、噴霧乾燥させて任意の投与経路を選択することも可能である。さらに、高分子化合物のマイクロ粒子にジンセノサイドRb₁をコーティングしたのちに、任意の投与経路を選択してもよい。

また、皮膚移植用ケラチノサイト培養シートの保護・維持にもジンセノサイドRb₁が有効と思われる。その他の移植用臓器（肝臓、腎臓、心臓、脾臓、肺、消化管、角膜、血管等）についても、移植手術が実施されるまでの間に低濃度のジンセノサイドRb₁で浸すか灌流することにより（特願平10—365560号、PCT/JP99/02550、いずれも「ジンセノサイドRb₁からなる脳細胞又は神経細胞保護剤」）、同臓器の細胞傷害や血管網の破綻が抑止され移植手術の成績も向上するものと期待される。さらに、ジンセノサイドRb₁は輸血用血球

成分・血小板の保護・維持、凍結卵子あるいは精子の保護・維持にも有効と思われる。

本発明のジンセノサイドRb₁静脈内投与は脊髄損傷動物の対麻痺を著しく改善する。周知のごとく、中枢神経組織は他の末梢組織に比べて外傷に対して最も脆弱な組織であるので、ジンセノサイドRb₁からなる医薬組成物が脊髄損傷の治療・予防・処置に著効を示すという事実は、ジンセノサイドRb₁が中枢神経組織以外の末梢組織の外傷にも有効であることを物語っている。実施例4に示すごとく、下位胸髄に圧負荷を加えられた脊髄損傷ラットは、損傷後にジンセノサイドRb₁を静脈内投与することにより立ち上がることが可能となる。生理食塩水（すなわち媒体（vehicle））のみを投与された脊髄損傷ラットはまったく立ち上がることができず、下肢の麻痺をきたすので、これらのことから判断すると、ジンセノサイドRb₁の脊髄損傷治療効果は歴史上最強のものと考えられる。従って、ジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物をリード化合物として使用することにより、今後、さらに様々な脊髄損傷・神経外傷・外傷治療薬が新規に開発されるものと期待される。また、ジンセノサイドRb₁の標的分子を同定することにより、標的分子の機能を修飾する新規化合物の合成も可能となる。このように、本発明は、有史以来人類を脅かしてきた脊髄損傷・神経外傷に対する治療薬を開発する上で必須のものとなる。

ひとたび脳の主要血管たとえばMCAが永久閉塞すると、当初強力な神経細胞保護剤で虚血巣周辺部（ischemic penumbra）の神経細胞が救済されても、脳血管の再生・再構築が達成されなければやがて虚血巣周辺部のいったん救済された神経細胞も死に至る可能性が高く、その結果、MCA永久閉塞後1ヶ月もすれば脳梗塞病巣が大きく拡大することがしばしば起こる。このような経時的脳梗塞病巣拡大は、臨床的にもよくみられることであり、脳梗塞患者の予後が悪いという病理組織学的根拠ともなっている。残念ながら、MCA永久閉塞後に静脈内投与することにより急性期のみならず脳梗塞発症後1ヶ月目においても病巣体積を非投与群の4分の1程度に縮小せしめる薬物はこれまで見出されていなかった。本発明ではジンセノサイドRb₁の脳梗塞発症後静脈内投与が、MCA永久閉塞後1ヶ月目において病巣を非投与群の4分の1程度に縮小せしめたので、このことから

判断すると、ジンセノサイド R b₁ は人類史上最も効果的な神経細胞保護剤と言える。従って、今後ジンセノサイド R b₁ もしくはその代謝産物をリード化合物として使用することにより、様々な神経細胞又は脳細胞保護剤を新規に作成することが可能となる。また、ジンセノサイド R b₁ の化学構造の一部を修飾することによりプロドラッグを作成し、既述のごとく任意の投与経路、投与方法を選択することができる。最後に、本発明の医薬組成物は副作用がほとんど無く、安定性の高い薬物を提供するものである。

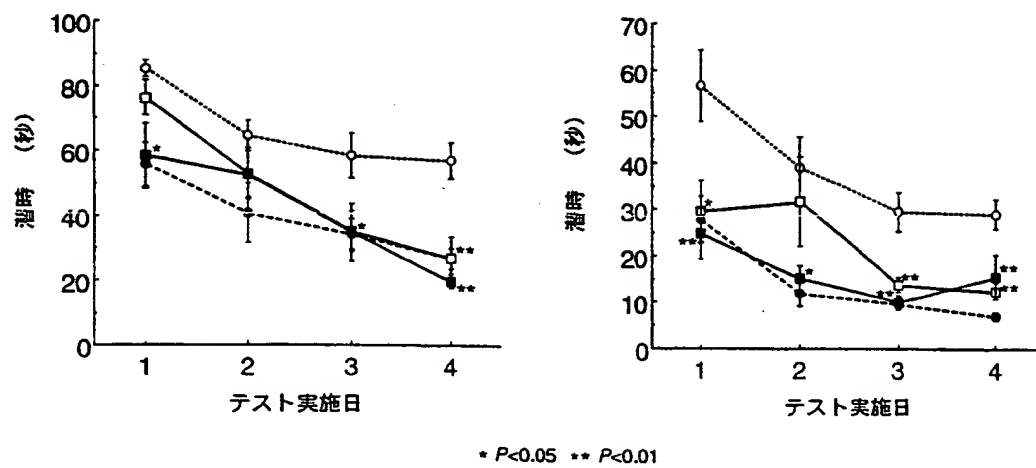
請 求 の 範 囲

1. ジンセノサイド Rb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患の予防、処置又は治療用医薬組成物。
2. 神経組織の損傷による神経組織の二次変性を抑制することからなる請求の範囲第1項に記載の予防、処置又は治療用医薬組成物。
3. 二次変性をきたす神経組織が脳皮質梗塞後の視床である請求の範囲第2項に記載の予防、処置又は治療用医薬組成物。
4. 神経組織の二次変性をきたす疾患が脊髄損傷である請求の範囲第2項又は第3項に記載の予防、処置又は治療用医薬組成物。
5. 損傷を受けた神経組織又は脊髄組織の血管の再生又は再構築によるものである請求の範囲第1項に記載の予防、処置又は治療用医薬組成物。
6. 血管が脳の血管である請求の範囲第5項に記載の予防、処置又は治療用医薬組成物。
7. 神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患が、外傷によるものである請求の範囲第1項に記載の予防、処置又は治療用医薬組成物。
8. 神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患が、脱髄である請求の範囲第1項に記載の予防、処置又は治療用医薬組成物。
9. 神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患が、脊髄損傷である請求の範囲第1項に記載の予防、処置又は治療用医薬組成物。
10. オリゴデンドロサイトのアポトーシス又はアポトーシス様細胞死を抑制させることによるものである請求の範囲第8項又は第9項に記載の予防、処置又は治療用医薬組成物。
11. 静脈内投与用製剤である請求の範囲第1項～第10項のいずれかに記載の医薬組成物。
12. 単回静脈内注入製剤又は静脈内持続投与用製剤である請求の範囲第1項～第10項のいずれかに記載の静脈内投与用製剤。
13. ジンセノサイド Rb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる血管の再生又は再構築を促進させるための医薬組成物。

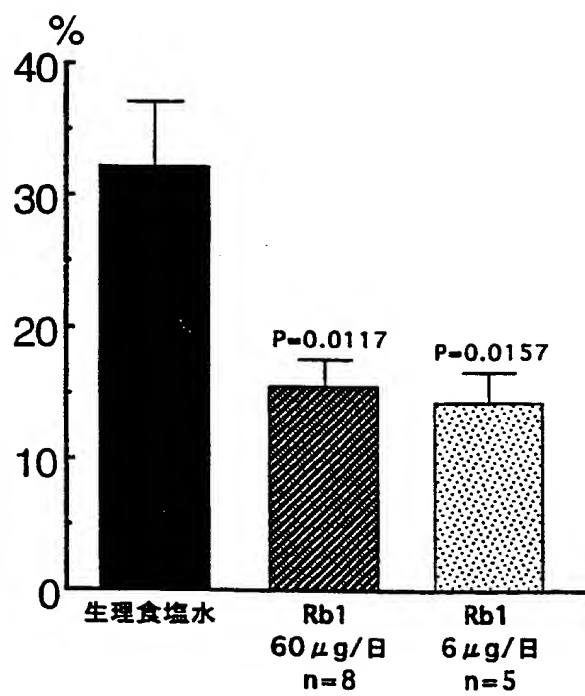
14. ジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる神経組織の二次変性の予防、処置又は治療用医薬組成物。
15. ジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる神経組織又は脊髄組織の外傷の悪化予防、処置又は治療用医薬組成物。
16. 外傷が、脊髄損傷、神経外傷もしくは頭部外傷である請求の範囲第15項に記載の医薬組成物。
17. ジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなるオリゴデンドロサイトのアポトーシス又はアポトーシス様細胞死を抑止させるための医薬組成物。
18. オリゴデンドロサイトのアポトーシスまたはアポトーシス様細胞死をきたす疾患が脊髄損傷である請求の範囲第17項に記載の医薬組成物。
19. ジンセノサイドRb₁もしくはその代謝産物又はそれらの塩を含有してなる脱髄の予防、処置又は治療用医薬組成物。
20. 脱髄をきたす疾患が脊髄損傷である請求の範囲第19項に記載の医薬組成物。
21. ジンセノサイドRb₁又はその代謝産物をリード化合物として、神経組織又は脊髄組織の疾患に対する予防、処置又は治療のための有効成分を探索する方法。
22. 神経組織又は脊髄組織の疾患が、神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患である請求の範囲第21項に記載の方法。
23. 神経組織又は脊髄組織の疾患が、脊髄損傷又は神経外傷である請求の範囲第21項又は第22項に記載の方法。
24. 請求の範囲第21項～第23項のいずれかに記載の方法により得られた神経組織又は脊髄組織の疾患に対する予防、処置又は治療剤。
25. 神経組織又は脊髄組織の疾患に対する予防、処置又は治療のための有効成分を探索するためのリード化合物としてのジンセノサイドRb₁又はその代謝産物の使用。
26. 脳細胞保護剤または神経細胞保護剤を探索するためのリード化合物としてのジンセノサイドRb₁又はその代謝産物の使用。
27. 神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患の予防、処置又は治療用医薬組成

物を製造するためのジンセノサイド R b , もしくはその代謝産物又はそれらの塩の使用。

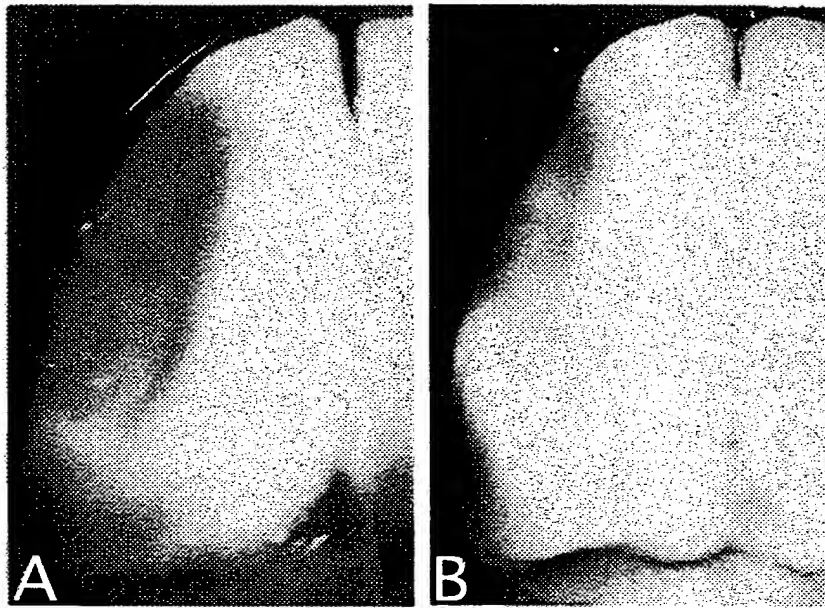
第 1 図



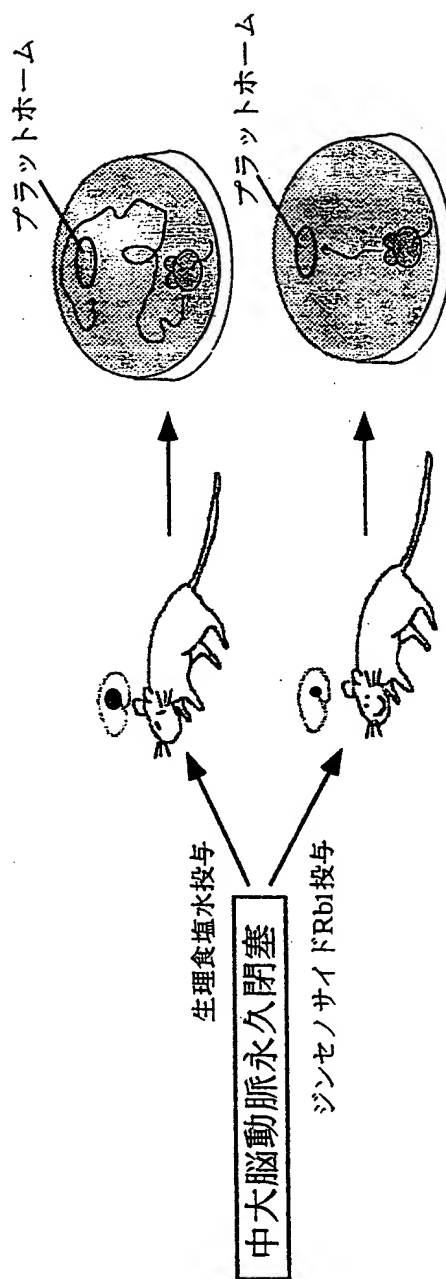
第 2 図



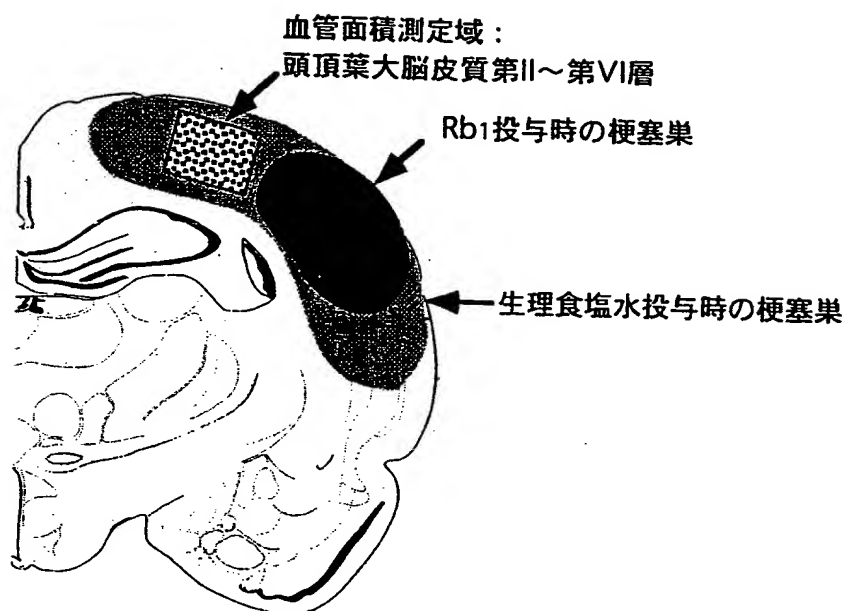
第 3 図



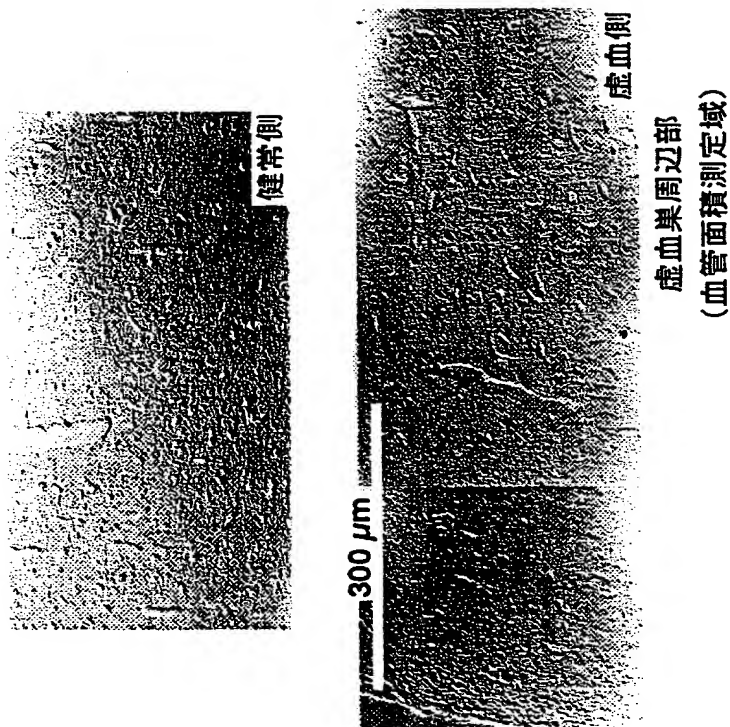
第 4 図



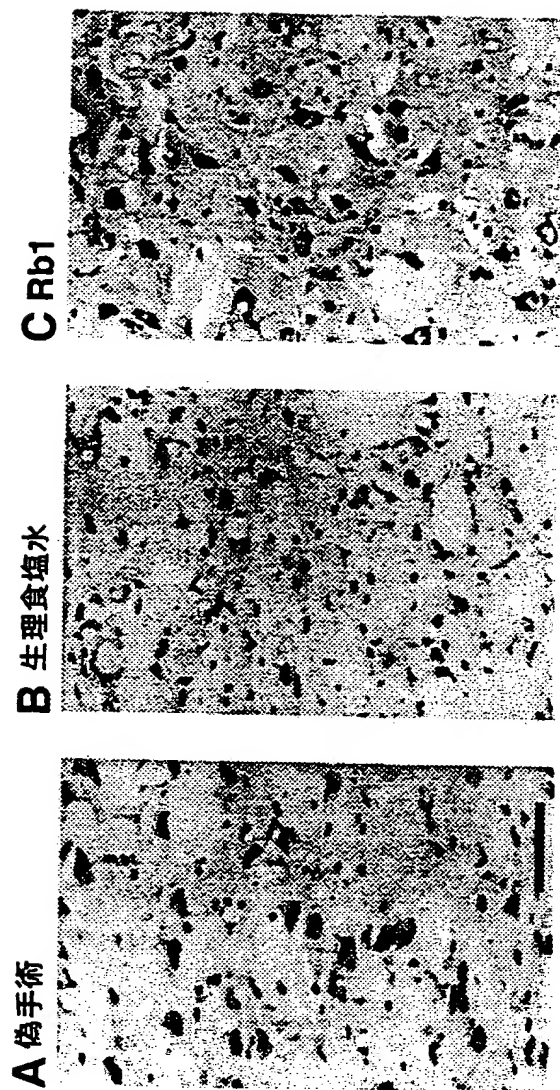
第 5 図



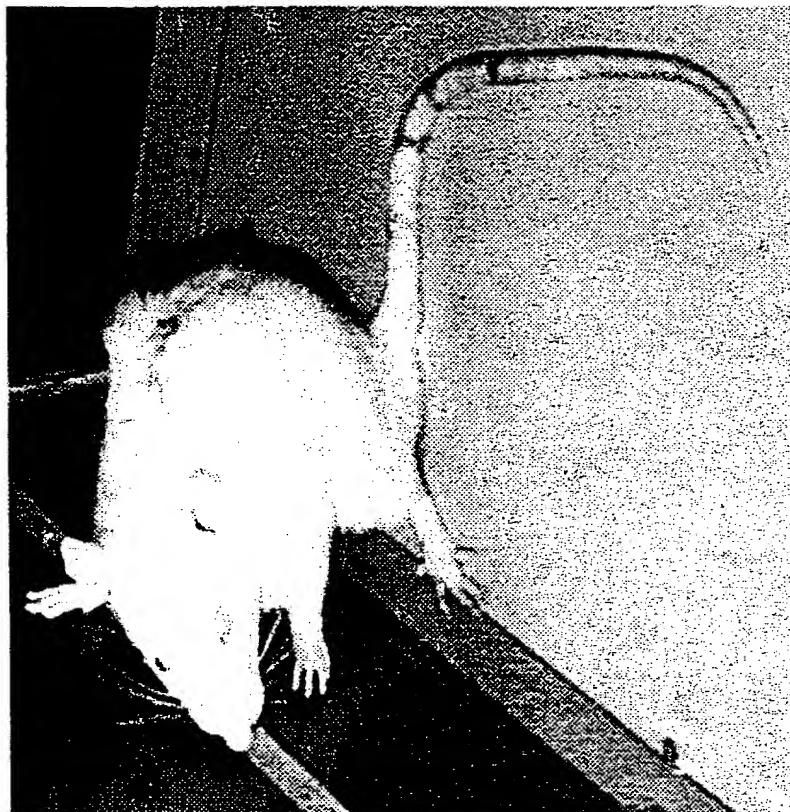
梗塞巣周辺の大脳皮質および健常側同部位大脳皮質血管網



第 7 図



第 8 図

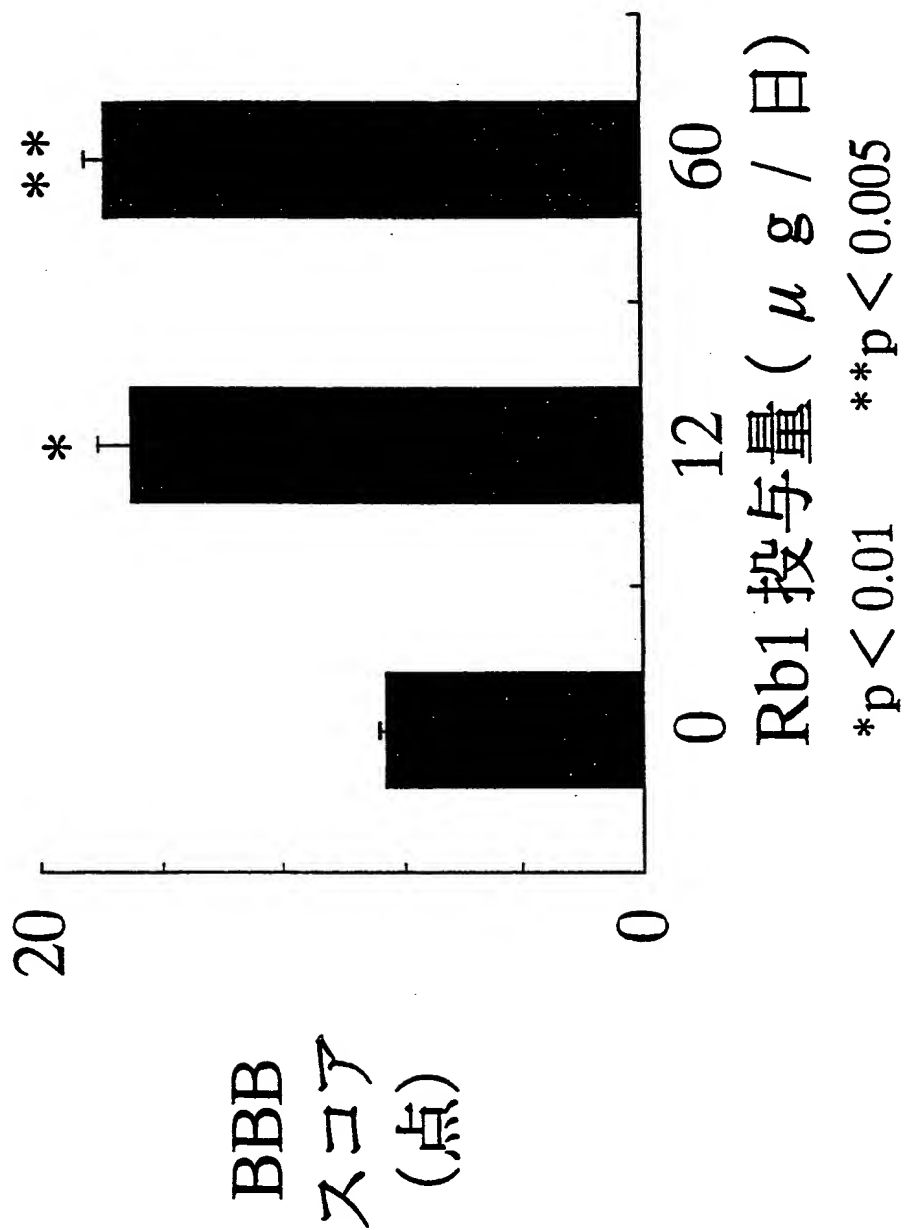


B.



A.

第 9 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06804

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 Int.Cl⁷ A61K31/704, A61K45/00, A61P25/00, A61P43/00 105
 G01N33/15, G01N33/50 // C07J17/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 Int.Cl⁷ A61K31/704, A61K45/00, A61P25/00, A61P43/00 105
 G01N33/15, G01N33/50, C07J17/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO, 90/08315, A (PANG, Peter, K., T. et al.), 26 July, 1990 (26.07.90) & US, 4966893, A & EP, 453515, A & JP, 4-504414, A & US, 5137878, A	21-25 1-12, 14-18, 27
X A	J.H.LIM, et al., "Protection of ischemic hippocampal neurons by ginsenoside Rb ₁ , a main ingredient of ginseng root", Neuroscience Research, Vol.28 (1997) p.191-200	21-26 1-12, 14-18, 27
X A	M.LIU, et al., "Protective Effects of Ginsenoside Rb ₁ and Rg ₁ on cultured Hippocampal Neurons", Acta Pharmaceutica Sinica, Vol.30, No.9 (1995) p.674-678	21-26 1-12, 14-18, 27
X A	ZHANG YING-GE, et al., "Influences of ginsenosides Rb ₁ and Rg ₁ on reversible focal brain ischemia in rats", Acta Pharmacologica Sinica, Vol.17, No.1 (1996) p.44-48	21-26 1-12, 14-18, 27
X	JP, 10-36387, A (Kureha Chemical Industry Co., Ltd.), 10 February, 1998 (10.02.98) (Family: none)	19-20

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family</p>
--	---

Date of the actual completion of the international search
 23 February, 2000 (23.02.00)

Date of mailing of the international search report
 07.03.00

Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06804

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	XIU CHEN, "Cardiovascular Protection by Ginsenosides and Their nitric Oxide Releasing Action", Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, Vol.23 (1996) p.728-732	13

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06804

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

1) Inventions as set forth in claims 1 to 12 pertain to medicinal compositions for diseases caused by damage in nerve or spinal tissues which contain ginsenoside Rb₁, inventions as set forth in claims 15 and 16 pertain to medicinal compositions for worsened trauma in nerve or spinal tissues which contain ginsenoside Rb₁, and invention as set forth in claim 27 pertains to utilization of ginsenoside Rb₁ for producing the above medicinal compositions.

2) Invention as set forth in claim 13 pertains to medicinal compositions for promoting vascular regeneration or reconstruction which contain ginsenoside Rb₁.

3) Invention as set forth in claim 14 pertains to medicinal compositions for secondary degeneration of nerve or spinal tissues which contain ginsenoside Rb₁.
(See extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP99/06804

第 II 欄の続き

4) Inventions as set forth in claims 17 and 18 pertain to medicinal compositions for inhibiting apoptosis or apoptosis-like cell death of oligodendrocytes which contain ginsenoside Rb₁.

5) Inventions as set forth in claims 19 and 20 pertain to medicinal compositions for demyelination which contain ginsenoside Rb₁.

6) Inventions as set forth in claims 21 to 23 pertain to methods for searching active ingredients for treating nerve or spinal tissue diseases by using ginsenoside Rb₁ as a lead compound, while invention as set forth in claim 25 pertains to methods for searching active ingredients in remedies for nerve or spinal tissue diseases by using ginsenoside Rb₁ as a lead compound.

7) Invention as set forth in claim 26 pertains to methods for searching brain cell protecting agents or nerve cell protecting agents by using ginsenoside Rb₁ as a lead compound.

Although inventions 1) to 7) as described above relate to techniques of applying ginsenoside Rb₁ or compounds obtained by using the same as a lead compound to medicines, the diseases to which these inventions are to be applied differ from each other. Moreover, it can be hardly said that these inventions are based on pharmacological effects closely relating to each other.

Such being the case, these groups of inventions as described in 1) to 7) are not considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept and, therefore, are not considered as complying with the requirement of unity of invention.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ A61K31/704, A61K45/00, A61P25/00, A61P43/00 105
G01N33/15, G01N33/50 // C07J17/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.⁷ A61K31/704, A61K45/00, A61P25/00, A61P43/00 105
G01N33/15, G01N33/50, C07J17/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	WO, 90/08315, A (PANG, Peter, K., T. et al.) 26. 7月. 1990 (26. 07. 90) &US, 4966893, A&EP, 453515, A&JP, 4-504414, A&US, 5137878, A	21-25 1-12, 14-18, 27
X A	J. H. LIM, et al., "Protection of ischemic hippocampal neurons by ginsenoside Rb ₁ , a main ingredient of ginseng root", Neurosci ence Research, Vol. 28 (1997) p. 191-200	21-26 1-12, 14-18, 27
X A	M. LIU, et al., "Protective Effects of Ginsenoside Rb ₁ and Rg ₁ on cultured Hippocampal Neurons", Acta Pharmaceutica Sinica, Vo l. 30, No. 9 (1995) p. 674-678	21-26 1-12, 14-18, 27

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

23. 02. 00

国際調査報告の発送日

07. 03. 00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

中木 亜希



4 P 9282

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

C (続き). 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X A	ZHANG YING-GE, et al., "Influences of ginsenosides Rb ₁ and Rg ₁ on reversible focal brain ischemia in rats", Acta Pharmacologica Sinica, Vol. 17, No. 1 (1996) p. 44-48	21-26 1-12, 14-18, 27
X	JP, 10-36387, A (呉羽化学工業株式会社) 10. 2月. 1998 (10. 02. 98) (ファミリーなし)	19-20
A	XIU CHEN, "Cardiovascular Protection by Ginsenosides and Their nitric Oxide Releasing Action", Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, Vol. 23 (1996) p. 728-732	13

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

- 1) 請求の範囲 1-12 はジニセリット[®] Rb₁ を含有してなる神経組織又は脊髄組織の損傷による疾患のための医薬組成物に係る発明であり、請求の範囲 15-16 はジニセリット[®] Rb₁ を含有してなる神経組織又は脊髄組織の外傷の悪化のための医薬組成物に係る発明であり、請求の範囲 27 は上記医薬組成物を製造するためのジニセリット[®] Rb₁ の使用に係る発明である。
- 2) 請求の範囲 13 はジニセリット[®] Rb₁ を含有してなる血管の再生又は再構築を促進するための医薬組成物に係る発明である。
- 3) 請求の範囲 14 はジニセリット[®] Rb₁ を含有してなる神経組織又は脊髄組織の二次変性のための医薬組成物に係る発明である。
(続きあり)

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第II欄の続き

- 4) 請求の範囲17-18はジニセリト^{*}Rb₁を含有してなるポリデント^{*}オクト^{*}の7ボ^{*}トシス又は7ボ^{*}トシス様細胞死を抑止するための医薬組成物に係る発明である。
- 5) 請求の範囲19-20はジニセリト^{*}Rb₁を含有してなる脱髄のための医薬組成物に係る発明である。
- 6) 請求の範囲21-23はジニセリト^{*}Rb₁をリード化合物として 神経組織又は脊髄組織の疾患に対する治療のための有効成分を探索する方法に係る発明であり、請求の範囲24は上記方法により得られた治療剤に係る発明であり、請求の範囲25は神経組織又は脊髄組織の疾患に対する治療剤の有効成分を探索するためのリード化合物としてのジニセリト^{*}Rb₁の使用に係る発明である。
- 7) 請求の範囲26は脳細胞保護剤又は神経細胞保護剤を探索するためのリード化合物としてのジニセリト^{*}Rb₁の使用に係る発明である。

上記1)～7)は、ジニセリト^{*}Rb₁又はこれをリード化合物として得られる化合物を医薬に適用する技術に関するものであるが、適用疾患はそれぞれ異なるものであり、また、これらが密接な薬理作用に基づくものであるとも言い難い。

したがって、1)～7)に記載した発明群が単一の一般的発明概念を形成するように連関している一群の発明であるとは認められないので、この国際出願は単一性を満たしていると認めることはできない。